

Aus dem Physiologischen Institut am Lehrstuhl für Physiologische Genomik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Magdalena Götz

# Gad1-Promotor abhängige Expression des grün- fluoreszierenden Proteins in nicht GABAergen Neuronen des clastro-endopiriformen Komplexes einer transgenen Mauslinie

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Maria-Sophie Riedemann  
aus Weiden in der Oberpfalz  
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. rer. nat. B. Sutor

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. M. Kerschensteiner

Prof. Dr. med. A. Straube

Mitbetreuung: PD Dr. med. A. Liesz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1.	Neuronale Netzwerke	3
2.2.	Pyramidenzellen und Interneurone des cerebralen Cortex	3
2.2.1.	Corticale Projektionsneurone	4
2.2.2.	Corticale Interneurone	5
2.3.	Weiterentwicklung der Untersuchungsmethoden	10
2.3.1.	Genetisch veränderte Tierlinien als Hilfsmittel zur Untersuchung	
	GABAerger Interneurone	10
2.3.1.1.	Transgene Tierlinien	11
2.3.1.2.	Knock-In und Knock-Out Modelle	12
2.3.2.	Die Mauslinie FVB-Tg(GAadGFP)45704Swn/J (GIN Maus)	14
2.4.	Fragestellung dieser Arbeit	14
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1.	Tiere	17
3.2.	Immunhistochemie	17
3.2.1.	Allgemeine Methoden	17
3.2.2.	Antikörper und Färbemethoden	19
3.2.3.	Bildaufnahme	21
3.2.4.	Quantifizierung der GFP-positiven Neurone der endopiriformen	
	Population	22

3.2.5.	Bildauswertung	23
3.3.	Morphologie	24
3.3.1.	Verwendete Antikörper und Färbemethoden	24
3.3.2.	Morphometrische Analyse und statistische Verfahren	25
3.4.	Elektrophysiologie	26
3.4.1.	Perfusionslösungen	26
3.4.2.	Intrazellulärlösung	27
3.4.3.	Präparation der Hirnschnitte	28
3.4.4.	Aufbau des Messsystems	29
3.4.5.	Ableitelektroden	29
3.4.6.	Messverfahren	30
3.4.7.	Auswertung elektrophysiologischer Daten und statistische Verfahren	31
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1.	Lokalisation und Verteilung der GFP-positiven Neurone in der endopiriformen Population	33
4.2.	Neurochemisches Profil der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population	37
4.2.1.	GFP-Verteilung	37
4.2.2.	Verteilung der SOM-positiven Interneurone	38
4.2.3.	Coexpression von Somatostatin in GFP-positiven Neuronen	39
4.2.4.	Coexpression von GFP in SOM-positiven Neuronen	39
4.2.5.	Coexpression von GFP-positiven Zellen mit Parvalbumin	41
4.2.6.	Immunreaktivität für GAD65/67	42
4.2.7.	Expression der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase	



	II $\alpha$ in der endopiriformen Population	45
4.3.	Zusammenfassung des neurochemischen Profils	49
4.4.	Morphometrische Analyse der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population	50
4.4.1.	Morphologie der einzelnen Zellgruppen	50
4.4.2.	Zellgröße und Zellfortsätze der rekonstruierten Neurone	56
4.4.3.	Sholl-Analyse der dendritischen Fortsätze	57
4.4.4.	Sholl-Analyse der axonalen Fortsätze	58
4.5.	Zusammenfassung der morphologischen Eigenschaften GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population	60
4.6.	Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population	61
4.6.1.	Identifikation der Zellen während der elektrophysiologischen Ableitungen	61
4.6.2.	Passive Eigenschaften GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population	62
4.6.2.1.	Das Ruhemembranpotenzial im Gruppenvergleich	64
4.6.2.2.	Vergleich der somatischen Membranzeitkonstante	64
4.6.2.3.	Analyse der Zellkapazität in den vier untersuchten Zellgruppen	65
4.6.3.	Strom-Spannungs-Beziehung GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population	65
4.6.3.1.	Eingangswiderstand im Gruppenvergleich	69
4.6.3.2.	Vergleich des Rektifikationskoeffizienten	70
4.6.3.3.	Untersuchung des Sag-Potenzials im Gruppenvergleich	70
4.6.4.	Analyse der Eigenschaften des Aktionspotenzials der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population	72

4.6.4.1.	Analyse des einzelnen Aktionspotenzials	72
4.6.4.2.	Dynamische Veränderung des Aktionspotenzials bei der Entladung	74
4.6.5.	Analyse des Entladungsverhaltens der GFP-positiven Neurone	79
4.6.5.1.	Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial	82
4.6.5.2.	Untersuchung der Maximalfrequenz	83
4.6.5.3.	Änderung der Entladungsfrequenz während eines einsekündigen Strompulses	84
4.7.	Zusammenfassung der elektrophysiologischen Daten	86
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	87
5.1.	Methodenwahl	87
5.1.1.	Immunhistochemie und Zellzahlbestimmung	87
5.1.2.	Morphologische Untersuchungsmethoden	88
5.1.3.	Methoden der elektrophysiologischen Ableitungen	89
5.2.	Die Lage der endopiriformen Population	90
5.3.	Die Verschaltung der endopiriformen Population	92
5.4.	Eigenschaften GFP-positiver Neurone in der endopiriformen Population	93
5.4.1.	Neurochemisches Profil	93
5.4.1.1.	Somatostatin-Expression in der endopiriformen Population	93
5.4.1.2.	Parvalbumin- und GAD65/67-Expression in der endopiriformen Population	94
5.4.1.3.	CaMKII $\alpha$ -Expression in der endopiriformen Population	95

5.4.2.	Morphologisches Profil der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population	96
5.4.3.	Elektrophysiologische Eigenschaften der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population	97
5.4.3.1.	Passive Membraneigenschaften	97
5.4.3.2.	Beurteilung der Strom-Spannungs-Beziehung	98
5.4.3.3.	Analyse der Eigenschaften eines einzelnen Aktionspotenzials und einer Serie von Aktionspotenzialen	98
5.5.	Betrachtung der GFP-Expression in der endopiriformen Population	99
5.5.1.	Stochastische Modelle zur Erfassung der Genaktivität	99
5.5.2.	GFP-Expression in der GIN-Maus	100
5.5.3.	Mögliche Ursachen der GFP-Expression in der endopiriformen Population	101
<b>6.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>104</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>Akkürzungsverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>110</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstaatliche Versicherung</b>	<b>111</b>
<b>12.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>

# 1. Zusammenfassung

In der sogenannten GIN-Maus (GIN: green fluorescent protein-expressing interneurons) wird GFP (green fluorescent protein) unter der Kontrolle des Promotors für das Gen der Glutamat-Decarboxylase (GAD67) exprimiert. Durch die GFP-Expression wird in dieser Mauslinie eine Untergruppe Somatostatin (SOM)-exprimierender GABAerger Interneurone markiert.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit war die Analyse einer Population GFP-exprimierender Neurone, die sich in den tiefen Schichten des piriformen Cortex befand und bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die GFP-exprimierenden Neurone in diesem Gebiet zeichneten sich durch eine hohe Dichte und eine lokal kompakte Anordnung aus. Ein anatomischer Vergleich mit den Daten aus dem „*Mouse Brain Atlas*“ von Franklin und Paxinos [2012] legte nahe, dass diese Zellen dem Nucleus endopiriformis und möglicherweise auch dem Claustrum zuzuordnen waren. Hierbei handelt es sich jeweils um Kerngebiete, deren genaue Funktion es noch zu klären gilt.

Um die in Frage stehenden Neurone von GFP-exprimierenden Neuronen anderer corticaler Gebiete abzugrenzen, wurden sie in dieser Arbeit anhand ihrer Lage zusammenfassend als endopiriforme Population (EPP) bezeichnet. Immunhistochemische, morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen an den Neuronen der EPP zeigten, dass diese nicht den klassischen corticalen GIN entsprachen, da weder eine Immunreaktivität für SOM noch für GAD65/67 nachgewiesen werden konnte. In einem Großteil der GFP-positiven Neurone wurde stattdessen überraschenderweise eine Immunreaktivität für CaMKII $\alpha$ , einem Marker für Pyramidenzellen nachgewiesen. Zell-Rekonstruktionen einzelner Biocytin-injizierter, GFP-positiver Neurone der EPP unterstützten die neurochemischen Befunde: die GFP-positiven Neurone zeigten eine Pyramidenzell-ähnliche Morphologie und unterschieden sich somit deutlich von den „klassischen“ GIN. Auch in der Elektrophysiologie zeigten sich deutliche Unterschiede. Sowohl die Analyse der passiven als auch die der aktiven Membranparameter legten nahe, dass sich die Neurone der EPP deutlich von den echten SOM-exprimierenden Interneuronen unterschieden und somit als eigenständige Zellgruppe zu betrachten waren. Die gewonnenen Daten wurden mit den Eigenschaften GFP-negativer Neuronen der gleichen Region sowie mit denen von GIN und von Pyramidenzellen in corticalen Rindenschichten verglichen.

Die vorliegende Arbeit belegt damit erstmalig, dass die Aktivierung des Promotors für das Gen der Glutamat-Decarboxylase in der untersuchten transgenen Mauslinie nicht notwendigerweise zur Ausbildung eines zellulären GABAergen Phänotyps führen muss.

## 2. Einleitung

### 2.1. Neuronale Netzwerke

Die Wahrnehmung von Sinneseindrücken ist ein komplexer integrativer Vorgang. Sensorische Stimuli werden dabei erst in ihre einzelnen Komponenten zerlegt, über afferente Bahnen zum cerebralen Cortex geleitet und anschließend wieder zu einem Gesamteindruck zusammengesetzt. Die Art und Weise wie solche Informationsverarbeitungsprozesse im Zentralnervensystem (ZNS) erfolgen, deren zelluläre Bestandteile sowie die Entwicklung dieser Bestandteile, ist eine zentrale Frage der Neurowissenschaften [Harris et al., 2013, Keller et al., 2014, Luhmann, 2017, Poldrack et al., 2015, Vicente et al., 2011, Woolgar et al., 2016]. Im cerebralen Cortex erfolgt diese Informationsübertragung hauptsächlich über Projektionsneurone, deren Aktivitätsmuster jedoch von exzitatorischen und inhibitorischen Interneuronen moduliert wird.

### 2.2. Pyramidenzellen und Interneurone des cerebralen Cortex

Beginnend mit den Untersuchungen von Golgi [1989] und Ramon y Cajal [1952] konnten viele Informationen über den cytoarchitektonischen Aufbau des cerebralen Cortex gewonnen werden. Inzwischen unterscheidet man eine Vielzahl unterschiedlicher Neuronenklassen. Die wichtigsten „*Gegenspieler*“ sind dabei glutamaterge Projektionsneurone und GABAerge Interneurone. Beide Zelltypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer immunhistochemischen, morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften deutlich. Im Folgenden soll ein Überblick über den Aufbau und die Merkmale von Pyramidenzellen und Interneurone des cerebralen Cortex gegeben werden.

### 2.2.1. Corticale Projektionsneurone

Die große Mehrheit der Projektionsneurone im cerebralen Cortex sind Pyramidenzellen. Sie bilden mit 70-80% die weitaus größte Neuronengruppe [Tamamaki et al., 2003] und zeichnen sich im Gegensatz zu den Interneuronen durch eine relativ uni-

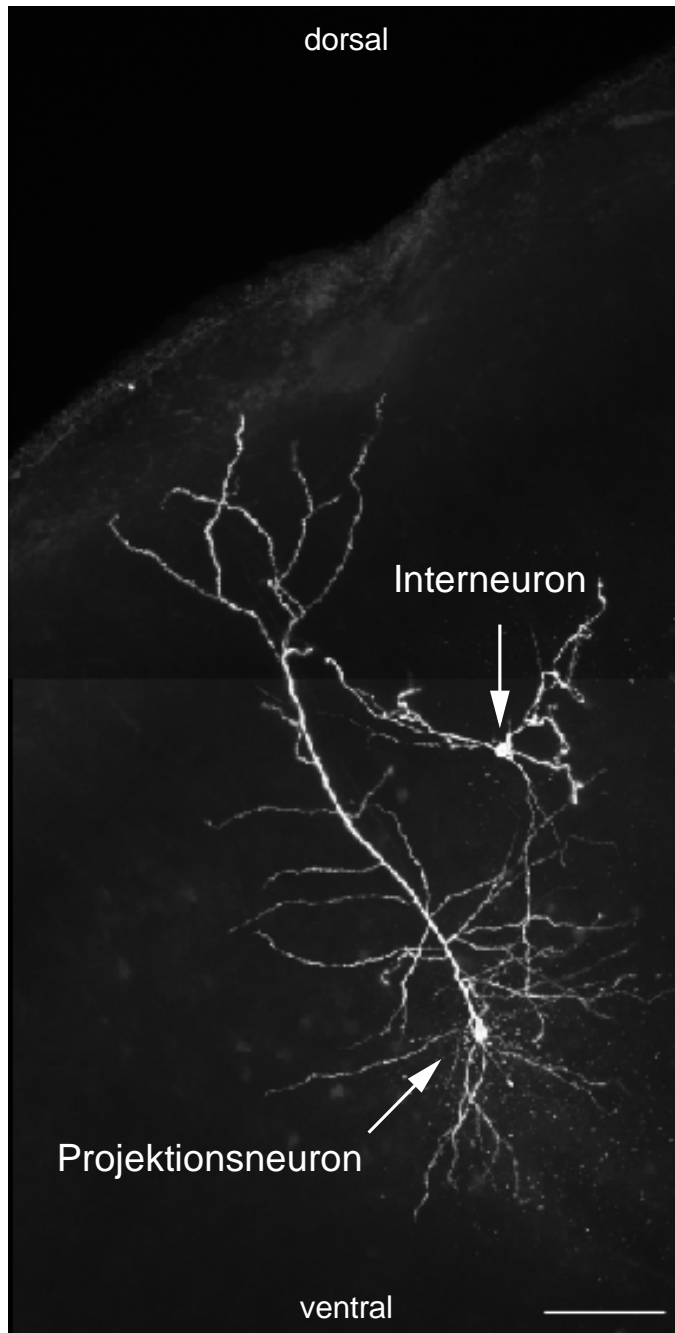


Abbildung 1: Darstellung einer corticalen Pyramidenzelle. Konfokale Bildaufnahme (25x0,6-fache Vergrößerung) einer Biocytin-injizierten Pyramidenzelle (links) sowie zusätzlich eines GIN (rechts) aus dem sensomotorischen Cortex (Maßbalken 100 µm).

forme Morphologie aus. Typisch ist ein großer, pyramidenförmiger Zellkörper mit einem oder zwei apikalen Dendriten. Vom Soma aus gesehen verlaufen diese Dendriten immer in Richtung der Piaoberfläche. Außerdem besitzen Pyramidenzellen mehrere kurze basale Dendriten, die sich oft horizontal ausbreiten. Die Dendriten weisen oft zahlreiche Dornfortsätze (sogenannte „*Spines*“) auf [DeFelipe et al., 1992, Kay et al., 2014]. Das Axon verlässt das Soma meist in entgegengesetzter Richtung zum apikalen Dendriten. Aus dem Axon austretende Kollaterale können lokal, vertikal oder horizontal zum Soma orientiert sein. Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine typische Pyramidenzelle aus eigenen Bildaufnahmen. Zusätzlich ist auch ein Interneuron abgebildet, dessen genauere Charakterisierung im nächsten Unterpunkt erfolgt.

Im Neocortex (Isocortex, d.h. sechs Schichten) sind Pyramidenzellen in fast allen Schichten vorhanden. Ausnahmen bilden die Schicht I, in

der sie nicht vertreten sind, und die Schicht VI, wo sie nur selten aufzufinden sind. Im dreischichtigen Allocortex sind die Pyramidenzellen vor allem in der von der Piaoberfläche aus gesehen tiefsten Schicht zu finden. Der Transmitter der Pyramidenzellen ist überwiegend Glutamat, welches über Glutamat-Rezeptoren exzitatorisch auf die nachgeschalteten Zellen wirkt. Zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren zählen der NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat), der AMPA- (engl. für  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazol-Propionsäure) und der Kainat-Rezeptor (benannt nach Kainsäure). Außerdem wirkt Glutamat an Rezeptoren der metabotropen Glutamat Rezeptor-Familie, mGluR [Emson et al., 1979].

Als atypische Pyramidenzellen bezeichnet man solche Neurone der Schicht II, die nur einen kurzen oder keinen apikalen Dendriten aufweisen oder solche in der Schicht V, die mit mehreren apikalen Dendriten ausgestattet sind [DeFelipe et al., 1992]. Besonders infragranuläre Pyramidenzellen scheinen sich durch Variabilität hinsichtlich ihrer Morphologie auszuzeichnen. Dennoch weisen auch alle atypischen Pyramidenzellen die wichtigsten morphologischen Gemeinsamkeiten aller Pyramidenzellen auf, nämlich Dendriten mit zahlreichen Dornfortsätzen und glutamaterge corticocorticale Projektionen [DeFelipe et al., 1992].

Inhibition oder Exzitation werden an verschiedenen Orten der Pyramidenzelle vermittelt. Synaptische Verbindungen können an distalen oder proximalen Dendritensegmenten, am Soma oder an proximalen oder distalen Axonsegmenten bestehen und so unterschiedliche Wirkung entfalten. Pyramidale Axone bilden mit nachgeschalteten Neuronen bevorzugt Synapsen des asymmetrischen Typs [Buhl et al., 1994, DeFelipe et al., 1992, Miles et al., 1996].

### **2.2.2. Corticale Interneurone**

Nur 15-30% aller corticalen Neurone sind Interneurone [Tamamaki et al., 2003]. Dennoch zeichnen sie sich durch eine weitaus größere Diversität als Pyramidenzellen aus. Durch ihre Vielfalt wird die Komplexität lokaler neuronaler Netzwerke deutlich erhöht. Im Gegensatz zu Pyramidenzellen sind die Ausbreitungsbereiche sowohl von Dendriten als auch von Axonen häufig lokal begrenzt und ihre Dendriten weisen keine oder nur wenige Dornfortsätze auf. Efferenzen der Interneurone sind sowohl



mit Pyramidenzellen als auch mit Interneuronen verschaltet und bilden vor allem Synapsen des symmetrischen Typs.

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Transmitter der Interneurone des cerebralen Cortex. Glycin und verschiedene Neuropeptide spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Synthese von GABA erfolgt aus dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD). Postsynaptisch wirkt GABA über GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren auf nachgeschaltete Zellen. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal, der bei Aktivierung die Leitfähigkeit für Chloridionen erhöht. Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der postsynaptisch die Kalium-Leitfähigkeit der Zelle erhöht und präsynaptisch die Calcium-Leitfähigkeit vermindert. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der nachfolgenden Zelle beziehungsweise zu einer Verminderung von erregenden postsynaptischen Potenzialen (EPSPs) [Howe et al., 1987].

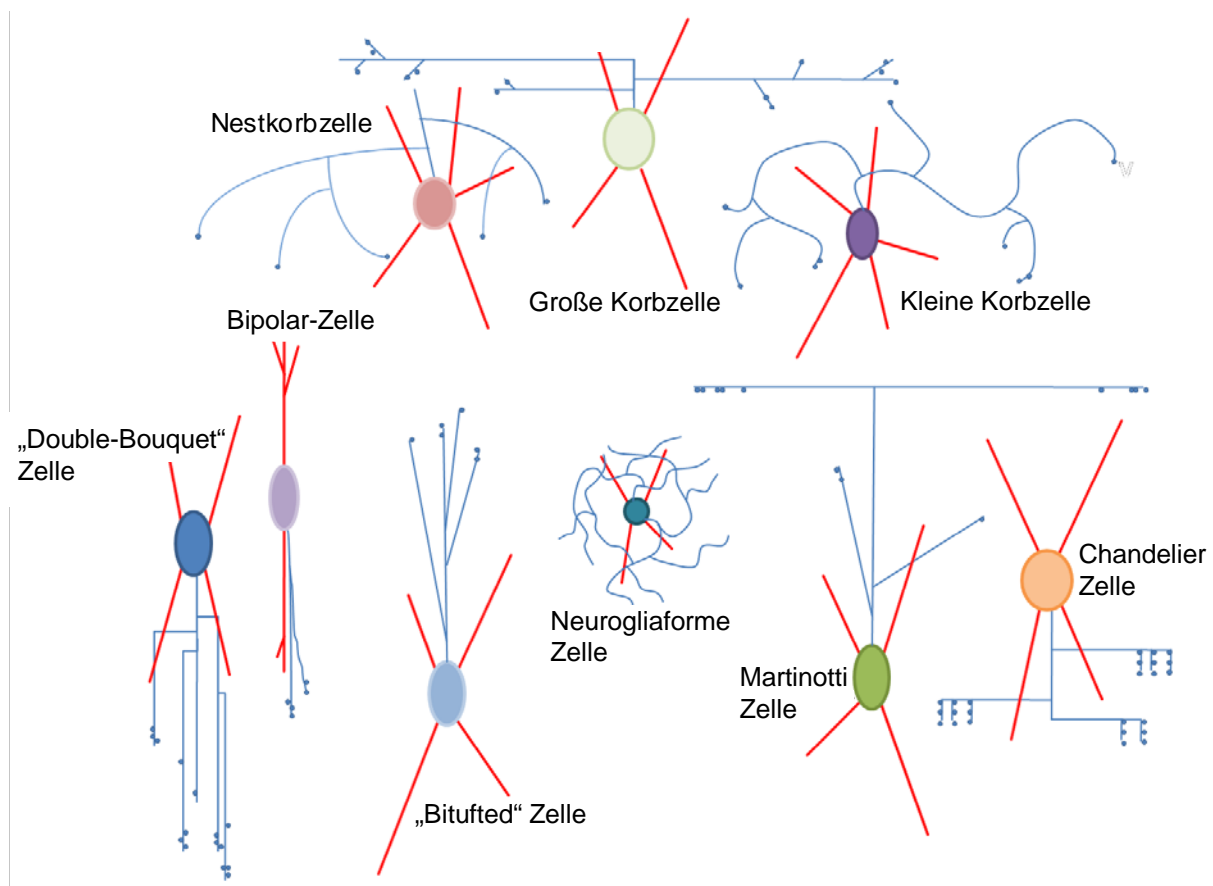


Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Interneuron-Klassen. Blau: Axon, Rot: Dendriten

Die Klassifizierung der GABAergen Interneurone erfolgt anhand ihrer Morphologie, ihrer Lage innerhalb einer corticalen Schicht, der Richtung ihrer axonalen Projektion, der Expression von Calcium-bindenden Proteinen und Neuropeptiden und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften [Ascoli et al., 2008, DeFelipe et al., 2013, Feldmeyer et al., 2018, Markram et al., 2004, Tremblay et al., 2016].

Zu den morphologischen Subklassen zählen Korbzellen, Chandelier-Zellen, Bipolar-Zellen, sogenannte „*Double-Bouquet*“-Zellen (engl.: „*bouquet*“ bedeutet Blumenstrauß), „*Bitufted*“ Zellen (engl.: „*bitufted*“ beschreibt eine Morphologie, bei welcher zwei Dendritenbäume das Zellsoma an jeweils gegensätzlichen Polen verlassen; engl.: „*tuft*“ bedeutet Büschel) und neurogliaforme Zellen [Freund et al., 1996, Markram et al., 2004]. Einige Interneuron-Klassen sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

- Etwa 50 % der Interneuronpopulation des cerebralen Cortex sind Korbzellen [Markram et al., 2004]. Sie bilden bevorzugt an den proximalen Dendriten und am Soma Synapsen mit nachgeschalteten Zellen. Der Begriff „*Korbzelle*“ stammt von ihrer „*korbartigen*“ Synapsenstruktur, die mehrere Korbzellen an der jeweils nachgeschalteten Pyramidenzelle bilden. Die weitere Untergliederung erfolgt anhand des dendritischen und axonalen Erscheinungsbildes in drei Unterklassen [Markram et al., 2004]. Im neurochemischen Profil zeichnen sich diese Zellen durch die Expression von Parvalbumin- (PV) oder Cholezystokinin (CCK) aus.
  - a) Große Korbzellen haben multipolare und dornenlose dendritische Zellfortsätze. Der axonale Baum verzweigt sich extensiv in den darüber und darunter liegenden Schichten und benachbarten sowie in weiter entfernten corticalen Säulen. Sie sind deshalb die vorrangige Quelle der lateralen Inhibition.
  - b) Kleine Korbzellen haben ein lokal begrenztes Axongeflecht, das nur selten die corticale Ursprungsschicht verlässt. Je nach Lage handelt es sich um multipolare, „*bitufted*“ oder bipolare Zellen.
  - c) Nest-Korbzellen sind eine Mischung großer und kleiner Korbzellen, die Synapsen am Soma nachgeschalteter Zellen bilden.
- Chandelier-Zellen sind Interneurone mit multipolarer oder bipolarer Morphologie, die vor allem mit Axonsegmenten nachgeschalteter Pyramidenzellen ver-

schaltet sind. Jede Zelle bildet radial verlaufende Reihen an Synapsen entlang des Axonsegments vieler Pyramidenzellen. Sie weisen einen lokal stark verzweigten Dendritenbaum auf und exprimieren in der Regel entweder Parvalbumin oder Calbindin oder beide Calcium-bindenden Proteine. Möglicherweise sind sie durch ihre Verschaltung an der Synchronisation des Informationsflusses über die Pyramidenzellen beteiligt [DeFelipe et al., 2013, Markram et al., 2004].

- Martinotti-Zellen finden sich in Schicht II bis VI und projizieren mit ihrem Axon in die Schicht I, wo es sich horizontal verzweigt und vor allem am distalen Dendritenbaum von Pyramidenzellen in benachbarten und weiter entfernten corticalen Säulen Synapsen bildet. Meist sind es Zellen mit ausgeprägtem, vorwiegend vertikal in gegensätzlichen Richtungen verlaufendem Dendritenbaum. Im Gegensatz zu vielen anderen Interneuronen können sie Dornfortsätze an ihren Dendriten aufweisen [Feldmeyer et al., 2018, Markram et al., 2004, Riedemann et al., 2018, Tremblay et al., 2016].
- Bipolare Zellen (BPC) sind kleine Zellen mit spindelförmigen oder ovalen Somata und Dendritenbäumen, die sich in gegensätzliche Richtungen verzweigen. Das Axon entspringt in der Regel einem primären Dendritenfortsatz und bildet ein schmales Band innerhalb aller Schichten. Bipolare Zellen können sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken [DeFelipe et al., 2013, Markram et al., 2004].
- „*Double-Bouquet*“ Zellen (DBC) liegen in Schicht II bis V und zeigen in der Regel eine bipolare Morphologie. Sie bilden eine Art vertikalen axonalen Zylinder, der stark verzweigt. Synapsen bilden sie vor allem mit den proximalen dendritischen Fortsätzen nachgeschalteter Pyramidenzellen [Markram et al., 2004].
- „*Bitufted*“ Zellen haben wie BPCs und DBCs gewöhnlich ovale Zellkörper und einen in zwei gegensätzlichen Richtungen verzweigten Dendritenbaum. Charakteristisch ist, dass sich die beiden Hauptdendriten in dichte Büschel verzweigen. Im Gegensatz zu den beiden vorher genannten Zelltypen kann sich das Axon auch in horizontaler Richtung stark ausbreiten. Die vertikale Projektion ist dafür nur geringfügig ausgeprägt. Sie liegen in Schicht II bis VI und projizieren vor allem auf den Dendritenbaum nachgeschalteter Pyramidenzellen [Markram et al., 2004].

- Neurogliaforme Zellen sind kleine, knopfartige Zellen mit schmalen, radiär verlaufenden und dornlosen Dendriten, die kaum verzweigen. Das Axon entspringt dem Zellkern oder einem proximalem Dendritenfortsatz und ist sehr stark verzweigt [Markram et al., 2004, Tremblay et al., 2016].

Neben der variablen Morphologie zeigen Interneurone auch sehr heterogene neurochemische Profile. Viele verschiedene Neuropeptide und Calcium-bindende Proteine werden von GABAergen Interneuronen exprimiert. Zum Beispiel können durch das Expressionsmuster von Somatostatin (SOM) und Parvalbumin (PV) zwei separate, nicht überlappende Interneuronpopulationen gekennzeichnet werden [Urban-Ciecko et al., 2016]. Allerdings gestaltet sich eine Klassifizierung anhand des neurochemischen Profils schwierig, da Neuropeptide und/oder Calcium-bindender Proteine in Interneuronen in unterschiedlichem Maße coexprimiert werden [Kawaguchi et al., 2002, Kubota et al., 2011, Riedemann et al., 2016, Rudy et al., 2011, Tamamaki et al., 2003, Xu et al., 2010].

Ebenso erweist sich die Klassifizierung anhand der passiven und aktiven elektrophysiologischen Eigenschaften als schwierig, da für die erhobenen Daten aus unterschiedlichen Studien oft keine einheitlichen Mess- und Analyseverfahren verwendet werden und diese somit nur beschränkte Aussagekraft besitzen [Ascoli et al., 2008]. Einige Klassifikationsschemata beziehen sich auf die Axon-Morphologie eines Interneurons zur weiteren Typisierung [Markram et al., 2004]. Neuerdings bietet die Einzelzell-Sequenzierung des Transcriptoms oder Proteoms einer Zelle einen neuen Ansatz der Zell-Klassifizierung [Tasic et al., 2016].

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass bisher keine allgemeingültigen Schemata existieren, um die Eigenschaften GABAerger Interneurone innerhalb einer Klasse (Morphologie, Immunhistochemie, Elektrophysiologie, usw.) und auch klassenübergreifend ausreichend zu erfassen und eine eindeutige Einteilung in unterschiedliche Gruppen zu erlauben [Ascoli et al., 2008, DeFelipe et al., 2013, Markram et al., 2004, McBain et al., 2001, Santana et al., 2013]. Diese Problematik führte in der Vergangenheit bereits so weit, dass Parra et al. [1998] vorschlugen, dass jedes Interneuron seine eigene Klasse bilde.

## **2.3. Weiterentwicklung der Untersuchungsmethoden**

Die anatomische Vielfalt der Interneurone zeichnete sich bereits in den Werken von Ramon y Cajal [1952] ab. Während Pyramidenzellen anhand ihrer weitgehend uniformen Morphologie und Lage für experimentelle Untersuchungen leicht identifiziert werden konnten, gelang dies nur in begrenztem Umfang für Interneurone. Im Laufe der Zeit wurden deshalb immer spezifischere Untersuchungsmethoden entwickelt, welche die Identifikation und Darstellung bestimmter Zellgruppen um ein vielfaches erleichterten oder überhaupt erst ermöglichten. Zwei wichtige Entwicklungsschritte, die viel zu dem heutigen Informationsstand beigetragen haben, sind die Kenntnis über kodierende Sequenzen des Genoms und die Kenntnis darüber, welche Funktionen sie erfüllen, sowie die Schaffung von Tierlinien, deren Genom durch die Entwicklung gentechnischer Methoden modifiziert werden konnte.

### **2.3.1. Genetisch veränderte Tierlinien als Hilfsmittel zur Untersuchung GABAerger Interneurone**

Im Jahr 1973 wurde erstmals ein rekombinanter Organismus geschaffen, indem ein konstruierter Plasmidring mit den Resistenzgenen für zwei verschiedene Antibiotika erfolgreich in die DNS (Desoxyribonukleinsäure) von *Escherichia coli* integriert wurde [Cohen et al., 1973].

Nach und nach wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf Invertebraten und höhere Wirbeltiere wie die Maus (*Mus musculus*) übertragen. Die Maus entwickelte sich dabei schnell zum Modelltier, da sie viele Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen Genom aufweist und zur Klasse der Säugetiere (Mammalia) zählt. Durch Sequenzanalyse der DNS in beiden Arten (Maus und Mensch) konnte gezeigt werden, dass von den etwa 30.000 gemeinsamen Genen nur 300 (1%) einzigartig für eine der beiden Spezies ist [Pennacchio, 2003b, Waterston et al., 2002] und ein speziesübergreifender Vergleich deswegen grundsätzlich möglich ist.

Viele der frühen genetischen Modelle beruhten auf spontanen Mutationen, die zufällig in Mauskolonien auftraten und einen erkennbar veränderten Phänotyp verursachten, wie beispielsweise der schwere kombinierte Immundefekt (severe combined immunodeficiency, SCID) [Bosma et al., 1983]. Solche spontanen Mutationen sind

aber sehr selten und die Ursache des veränderten Phänotyps ist oft schwer zu identifizieren, zu lokalisieren und zu analysieren.

#### 2.3.1.1. *Transgene Tierlinien*

Durch Weiterentwicklung der Genanalyse [Lindblad-Toh et al., 2001, Pennacchio, 2003a, Waterston et al., 2002] zusammen mit der Genmanipulation, entstand die Möglichkeit rekombinante Tierlinien (transgenic founder line) mit identischem genetischen Hintergrund zu schaffen, die über einen langen Zeitraum hinweg konstant blieben. Diese Methode wird auch heute noch angewendet.

Der Gentransfer erfolgt dabei durch Mikroinjektionen rekombinanter DNS in den Pronukleus der befruchteten Mauszygote im Einzellstadium, die in ein fruchtbares Weibchen übertragen wird [Doyle et al., 2012, Gordon et al., 1980]. Konkret wird dabei ein DNS-Konstrukt bestehend aus Protein-kodierenden und regulatorischen Elementen injiziert. Damit ein solches Transgen erfolgreich in der eukaryotischen Zelle erkannt und übersetzt wird, darf es eine bestimmte Basenpaarlänge nicht überschreiten. Zusätzlich müssen, neben dem rekombinanten Genabschnitt selbst, funktionstüchtige regulatorische Genabschnitte und eine Poly-A-Sequenz vorhanden sein. Um das Expressionsmuster überprüfen zu können, wird das Transgen häufig an ein Reportergen gekoppelt. Ein Beispiel dafür ist das grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP) oder die labortechnisch verbesserte Variante „*enhanced green fluorescent protein*“ (eGFP). GFP wurde 1961 erstmals von Shimomura als ein Protein der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert [Shimomura et al., 1962]. Die Übertragung des Transgens auf die Wirtszelle erfolgt meist mit Hilfe eines Plasmidvektors oder durch virale Transfektion. Zellen, die das Transkript erfolgreich exprimieren, können mithilfe des Reportergens durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Eine oder mehrere Transgen-Kopien werden dabei in nicht vorhersagbare Abschnitte des Genoms integriert und bei der Zellteilung an alle Tochterzellen weitergegeben. In Abhängigkeit der verwendeten regulatorischen Sequenzen und auch des Ortes der Integration in das Genom des Wirtstieres wird das Transgen in einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Muster exprimiert. Jede transgene Tierlinie muss deswegen sorgfältig charakterisiert werden [Nagy et al., 2003, Ryding et al., 2001].

Obwohl solche transgenen Tierlinien sehr vielversprechend sind, bergen sie auch gewisse Risiken. Eines der Probleme wurde bereits erwähnt: nämlich dass der genaue Integrationsmechanismus und -ort des Transgens in diesem Verfahren nicht bekannt ist. Im Falle von mehreren eingefügten Genkopien kann es zu einer Überexpression des Transskripts im Vergleich zum endogenen Expressionsniveau der Wildtyptiere kommen. Außerdem kann das Zusammenspiel des Promotors beziehungsweise der Genkopie mit lokal vorhandenen Transkriptionsfaktoren nicht vorhergesagt werden, wodurch es zu Gen-Silencing oder Gen-Enhancing kommen kann. Zuletzt soll noch erwähnt werden, dass aufgrund der limitierten Gesamtlänge des Konstrukts oft nur Teile von Genen und regulatorischen Elementen eingefügt werden können. Transgene Tierlinien, die mithilfe des gleichen Genkonstrukts erzeugt wurden, weisen deshalb unvermeidlich Unterschiede im Phänotyp auf [Doyle et al., 2012, Nagy et al., 2003].

#### 2.3.1.2. *Knock-In und Knock-Out Modelle*

Beim Gen-Targeting oder der homologen Rekombination wird ein bestimmtes Gen gezielt angesteuert und inaktiviert (Knock-Out) oder mit einer rekombinanten Genkopie vertauscht (Knock-In) [Thompson et al., 1989]. Dieser gezielte Eingriff unterscheidet Knock-In- und Knock-Out-Modelle grundsätzlich von transgenen Tierlinien. Bei der homologen Rekombination werden pluripotente Stammzellen der Maus manipuliert. Durch Verhinderung ihrer Differenzierung können diese Zellen permanent in diesem Stadium gehalten werden. Mit einem Targeting-Vektor kann ein bereits bekanntes Gen gezielt angesteuert werden. Zunächst diente diese Technik vor allem der Inaktivierung von bestimmten Genen („*loss of function*“). Meistens wird dabei nicht ein ganzes Gen ausgeschaltet, sondern z.B. nur Teile der transkribierten Abschnitte. Der Funktionsverlust muss entsprechend geprüft werden.

Wird die Manipulation in Keimbahnzellen durchgeführt, können diese Tiere zum Teil sehr komplex veränderte Phänotypen aufweisen. Viele sterben bereits im Embryonalstadium, da eben alle Zellen durch die Genablation in ihrer Funktion eingeschränkt wurden. Da die molekularen und zellulären Funktionen eines bestimmten Gens oft nicht komplett nachvollzogen werden können, ist der Mechanismus hinter dem Knock-Out eines bestimmten Gens oft schwer zu verstehen und der entstehen-

dene Phänotyp umso schwerer zu charakterisieren. Zudem kann die Funktion eines entfernten Gens durch die eines anderen Gens kompensiert werden [Nagy et al., 2003, Ryding et al., 2001].

Vor allem aus den letztgenannten Gründen wurde das Gen-Targeting durch sog. „*induzierbare*“ Knock-Outs weiter verfeinert [Ablain et al., 2016, Branda et al., 2004, Ryding et al., 2001, Young et al., 2008]. Diese Methode beruht auf der Verwendung von Rekombinasen, z.B. der bakteriellen Cre-Rekombinase (Cre: causes recombination), die ortsspezifische genetische Rekombinationen ermöglichen [Branda et al., 2004, Lakso et al., 1992, Sternberg et al., 1981, Tang et al., 2015]. Dem Zielgen, das in das Genom eingebaut werden soll, werden kurze repetitive Sequenzen hinzugefügt, die als „*locus of crossover*“ (Lox) bezeichnet werden, und durch Rekombinasen erkannt werden können (Lox bezeichnet den Ort, an dem die Cre-Rekombinase angreift). Durch Stammzellmanipulation können Mauslinien (genannt „*floxed mice*“ bei Verwendung der Cre/Lox-Strategie) geschaffen werden, die diese repetitiven Sequenzen zu beiden Seiten des Gens, das untersucht werden soll, tragen. Gleichzeitig wird eine zweite transgene Mauslinie (Driver-line) entwickelt, in der die entsprechende Rekombinase gekoppelt an einen zellspezifischen Promotor in das Genom integriert wurde. Durch Kreuzung beider Tierlinien entstehen nach den Regeln der Vererbung Nachkommen, bei welchen die Genablation nur in den Zellen stattfindet, die aufgrund des spezifischen Promotors die entsprechende Rekombinase exprimieren. Die Rekombinase erkennt dann die repetitiven Sequenzen beidseits des Zielgens und entfernt es aus dem Genom der Maus. Dies ermöglicht die gezielte Untersuchung einer Genablation in einem bestimmten Gewebe ohne Beeinträchtigung anderer Zellgruppen („*induzierbarer*“ Knock-Out) [Ryding et al., 2001].

Weitere Verfeinerungen der Technik des „*induzierbaren*“ Knock-Outs erlaubt es, ein bestimmtes Gen nicht einfach nur abzuschalten, sondern mit einer rekombinant hergestellten Genkopie auszutauschen. Dadurch entstehen Knock-In-Tierlinien, die nur in Zellen von Interesse das entsprechende Gen auch exprimieren [Doyle et al., 2012, Taniguchi et al., 2011].



### 2.3.2. Die Mauslinie FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J (GIN-Maus)

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an einer homozygoten Mauslinie, bezeichnet als FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J durchgeführt [Oliva et al., 2000]. Es handelt sich hierbei um eine transgene Tierlinie, in der GFP unter der Kontrolle des

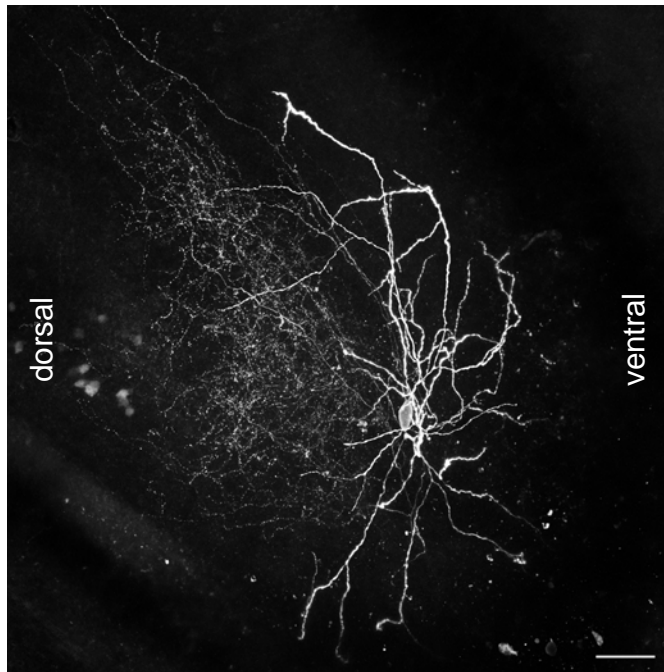


Abbildung 3: Darstellung einer GIN aus dem Hippocampus der Maus. Konfokale Aufnahme (25x0.6-fache Vergrößerung) eines Biocytin-injizierten GIN aus dem Hippocampus der Maus wie bei Oliva et. al. (2000) erstbeschrieben (Maßbalken 50 µm).

Glutamat-Decarboxylase 1 (Gad1)-Promotors in das Mausgenom integriert wurde. Die Idee hinter diesem experimentellen Ansatz war die Schaffung einer Mauslinie, in der hemmende GABAerge Interneurone durch das GFP (GFP-expressing inhibitory interneurons = GIN) markiert werden, wodurch diese Zellen identifizierbar und somit für verschiedene Untersuchungsmethoden (inklusive Elektrophysiologie) leichter zugänglich wurden. Letztendlich ergab sich als Phänotyp eine Mauslinie, in der eine Untergruppe Somatostatin-haltiger, GABAerger Interneurone GFP-positiv erschien. Diese

Mauslinie erlaubte deshalb die genaue Untersuchung dieses Interneuron-Subtyps in unterschiedlichen Arealen des Gehirns.

Im Hippocampus wurden die GIN elektrophysiologisch als eine Gruppe regulär entladender Nervenzellen beschrieben, die mit relativ hoher Frequenz feuern und nur geringfügige Adaptation zeigen [Oliva et al., 2000]. Abbildung 3 zeigt eine Aufnahme eines solchen GIN aus der CA3-Schicht (Cornu ammonis) des Hippocampus. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Muster der Coexpression verschiedener Calcium-bindender Proteine und Neuropeptide in GFP-exprimierenden Interneuronen dieser Mauslinie sehr vielfältig war und deswegen die Möglichkeit zur weiteren Subklassifizierung bestand. Morphologisch zählen die GIN hauptsächlich zur Gruppe der Martinotti-Zellen [Ma et al., 2006, Riedemann et al., 2016, Riedemann et al., 2018, Xu et al., 2010].

Neben den oben bereits genannten allgemeinen Einschränkungen hat diese transgene Mauslinie den Vorteil, dass im Gegensatz zu Knock-In- oder Knock-Out-Modellen die Expression der endogenen Allele unverändert blieb. In GAD67-GFP-Knock-In-Mäusen wurde ein deutlich reduzierter GABA-Gehalt im cerebralen Cortex festgestellt [Tamamaki et al., 2003]. Da GABA vor allem während der prä- und postnatalen Entwicklung für die Reifung von Neuronen und Schaltkreisen im Neocortex wichtig ist [Sutor et al., 2005], kann ein reduzierter GABA-Gehalt zu Fehlentwicklungen im Neocortex führen [Denter et al., 2010].

## 2.4. Fragestellung der Arbeit

Mittels der von Oliva et al. (2000) generierten Mauslinie konnten die Eigenschaften dieser GFP-positiven GABAergen Interneurone in verschiedenen Hirnregionen untersucht werden. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse eines Gehirnschnittes fiel eine sehr dichte Population dieser GFP-positiven Zellen im Bereich des temporalen/piriformen Cortex auf. Nach Franklin und Paxinos [2012] waren diese GFP-positiven Neurone dem Nucleus endopiriformis und/oder dem Claustrum zuzuordnen, hier auch als claustro-endopiriformer Komplex [Smith et al., 2018] bezeichnet (vgl. Abb. 4-6).

Weil die GFP-positiven Neurone im claustro-endopiriformen Komplex der GIN-Maus bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurden, war eine detaillierte Charakterisierung dieser Zellen das Ziel der hier vorliegenden Arbeit.

Insbesondere sollte den folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

- 1) Lässt sich das neurochemische Profil dieser GFP-positiven Neurone mit dem von GIN aus anderen corticalen Gebieten vergleichen?
- 2) Unterscheiden sich diese GFP-positiven Neurone von GIN aus anderen corticalen Gebieten im Hinblick auf ihre Morphologie?
- 3) Weisen diese GFP-positiven Neurone elektrophysiologische Eigenschaften auf, die sie mit GIN aus anderen Cortex-Gebieten verbinden oder trennen?

Zur Beantwortung dieser Fragen erfolgte eine gründliche Analyse der immunhistochemischen, morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen im Vergleich zu den Eigenschaften von GFP-negativen Neuronen der gleichen Region und von GIN und Pyramidenzellen corticaler Rindenschichten. Die GFP-positiven Neurone der genannten Population wurden in der vorliegenden Arbeit als endopiriforme Population (EPP) bezeichnet.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Tiere

Für alle Experimente wurden Mäuse der transgenen Linie FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J (Jackson Laboratories, Maine, USA) verwendet [Oliva et al., 2000]. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall des Instituts bei konstanter Raumtemperatur und einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Wasser und Futter standen für die Tiere frei zur Verfügung.

Alle experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 3.2. Immunhistochemie

#### 3.2.1. Allgemeine Methoden

Für immunhistochemische Untersuchungen ausgewählte Tiere (postnataler Tag P30-120) wurden durch eine Intraperitoneal-Injektion von Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Rompun (10 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach Ausfall aller Schutzreflexe wurden die Tiere transkardial mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in Phosphat-Puffer (phosphate buffer, PB) perfundiert. Durch dieses Verfahren wurden Erythrozyten aus den Hirngefäßen und -kapillaren ausgewaschen, die sonst aufgrund ihrer Peroxidase-Aktivität einen starken unspezifischen Hintergrund verursachen.

Die Gehirne wurden im Ganzen entnommen, über Nacht in 4% PFA-Lösung fixiert und anschließend so lange in 10% Sucroslösung in PB gelagert, bis sie sich absenkten. Dieser Schritt wurde jeweils mit 20%- und 30%-haltiger Sucroslösung wiederholt.

Sucrose diente in dieser Anwendung als Kryoprotektor, der die Bildung von Eiskristallen in gefrorenen Schnitten durch partielle Dehydratation verhinderte. 30% Sucroslösung gefriert etwa mit der gleichen Geschwindigkeit wie in PFA fixiertes Gewebe

[Lineberger, 1980]. Vorteilhaft an diesem Verfahren ist die gute Antigenerhaltung des Gewebes, wodurch die Bestimmung des Expressionsprofils verschiedener Neuropeptide und Enzyme vereinfacht wird.

Anschließend wurden coronale Schnitte mit einer Dicke von 30-40 µm mittels eines Kryostats (CM3050, Leica, Wetzlar, Deutschland) hergestellt, in saubere 48-Lochplatten übertragen (Greiner GmbH, Deutschland) und vor weiterer Verwendung mindestens 3 Mal mit PB gewaschen. Um die Permeabilität der Lipidmembran für Antikörper zu erhöhen, wurden die Gewebeschnitte anschließend in einer „Perforationslösung“ mit dem Detergenz Triton X-100 (0,2-0,3% in PB: PB-T) für ein bis zwei Tage gelagert.

Der PB setzte sich zusammen aus 400 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (200 ml), 400 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50 ml) und destilliertem Wasser (750 ml), der pH-Wert lag bei 7,4.

### **3.2.2. Antikörper und Färbemethoden**

Vor der Anwendung der jeweiligen Primärantikörper wurden Verdünnungsreihen erstellt, um das optimale Niveau zwischen Antikörperspezifität und unspezifischem Hintergrund zu ermitteln. Alle Antikörper wurden nach den Datenblättern der Hersteller auf ihre Spezifität hin untersucht. Dabei konnte keine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen oder Peptiden gefunden werden, die ebenfalls für die immunhistochemische Untersuchung verwendet wurden.

Zur Bestimmung des neurochemischen Profils wurden die Schnitte in unterschiedlichen Kombinationen von Primärantikörpern inkubiert. Vor Beginn der Inkubation wurden die durch Triton X-100 perforierten Schnitte für 2 Stunden in PB mit 5% Ziegen Serum (normal goat serum, NGS) gelagert, um einer unspezifischen Antikörperbindung entgegenzuwirken.

<b>Antikörper und Verdünnung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Anbieter</b>
Calcium/Calmodulin-Kinase II $\alpha$ (CaM-Kinase II $\alpha$ ) 1:400	Aminosäuresequenz 461-478 der CaM-Kinase II- $\alpha$ der Ratte	Sigma-Aldrich, C6974, polyklonaler Antikörper aus der Maus
Glutamat-Decarboxylase 65/67 (GAD65/67) 1:2000	synthetisch hergestelltes Peptid der C-terminalen Region der menschlichen GAD67	Sigma-Aldrich, G5163 polyklonaler Antikörper aus dem Hasen
Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) 1:400	ein mit einem Polyhistidin-Tag versehenes grün-fluoreszierendes Protein (GFP) des <i>Aequorea victoria</i>	Millipore, 06-896, polyklonaler Antikörper aus dem Huhn
NeuN 1:200	gereinigte Zellkerne aus dem Maushirn	Millipore, MAB377, monoklonaler Antikörper aus der Maus
Parvalbumin (PV) 1:1000	gereinigtes Parvalbumin aus Innereien	Swant 235, monoklonaler Antikörper aus der Maus
Somatostatin (SOM) 1:200	synthetisch hergestelltes 1-14 zyklisches Somatostatin	Millipore, MAB354, monoklonaler Antikörper aus der Ratte

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper sowie deren Antigene, Hersteller und Katalognummer

<b>Sekundärantikörper und Verdün- nung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Anbieter</b>
Alexa Fluor 488-konjugierter IgG-Antikörper gegen Huhn 1:500	Ziege	Invitrogen, Waltham, MA, A11039
Alexa Fluor 594-konjugierter IgG-Antikörper gegen Maus 1:500	Ziege	Molecular Probes, Waltham, MA, A-11032
Cy3-konjugierter IgG-Antikörper gegen Maus 1:500	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland, 115-165-003
Dylight 649-konjugierter IgG-Antikörper gegen Maus 1:500	Ziege	Dianova, 115-606-072
Cy3-konjugierter IgG-Antikörper gegen Hase 1:1000	Esel	Dianova, 711-165-152
Dylight 649-konjugierter IgG-Antikörper gegen Ratte 1:1000	Ziege	Rockland, Limerick PA, 613-442-002

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper sowie deren Wirt, Hersteller und Katalognummer.

Da durch die Behandlung der Zellen mit PFA eine Reduktion der GFP-Fluoreszenz auftreten kann, wurde das Fluoreszenzsignal in den GFP-positiven Zellen mit Hilfe eines polyklonalen anti-GFP Antikörpers (Huhn, Millipore, Billerica, MA, 06-896) verstärkt. Eine Zusammenfassung aller verwendeten Primärantikörper mit Hersteller, Katalognummer und verwendeter Verdünnung findet sich in Tabelle 1. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte in 5% NGS-haltiger PB-T. Die Inkubation mit den Antikörpern wurde bei 4°C auf einem horizontalen Schüttler durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug für alle Antikörper 24-48 Stunden.

Vor Beginn der Inkubation in Sekundärantikörper wurden die Schnitte mehrmals in PB gewaschen, um die Reaktion des Primärantikörpers zu stoppen. Sekundärantikörper waren an Fluorochrome gekoppelt, um den Nachweis positiver Immunreaktionen unter Fluoreszenzlicht zu ermöglichen. Die Verdünnung der Sekundärantikörper fand in der gleichen Lösung wie die der Primärantikörper statt. Die Inkubationszeit betrug 3-4 Stunden und wurde zur Verhinderung des Ausbleichens der Fluoreszenz nur im Dunkeln durchgeführt. Hersteller, Katalognummer und die Verdünnung der Sekundärantikörper können Tabelle 2 entnommen werden.

Im Anschluss an die Färbung mit Sekundärantikörper wurden die Schnitte mit PB gewaschen und für 15-30 Minuten in 4',6-diaminido-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich, D9564) in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert, um die Zellkerne darzustellen. Nur Zellen, deren Zellkerne identifiziert werden konnten, wurden in immunhistochemischen Zählungen ausgewertet.

Zuletzt wurden die Schnitte nochmals in PB gewaschen und je 4 Schnitte auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Die Schnitte wurden mit einem auf MOWIOL-Basis hergestellten Eindeckmedium überzogen und eingedeckelt (24x60 mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland). Das Einbettmedium bestand aus 6 ml Glycerol, 2,4 g MOWIOL 4-88, 12 ml Tris-Cl (0,2 M, pH 8,5) und 6 ml ddH<sub>2</sub>O.

### **3.2.3. Bildaufnahme**

Bildaufnahmen wurden an einem LSM710 Konfokalmikroskop (Zeiss, Deutschland) mit Hilfe der Software Zen (Zeiss) erstellt. Dazu wurde pro Präparat jeweils eine Aufnahme aus jeder Hemisphären gemacht. Zur Beurteilung des Verteilungsmusters



von Somatostatin (SOM) und GFP wurde ein 10-fach vergrößerndes optisches Luftobjektiv mit zusätzlicher digitaler Vergrößerung von 0,6 verwendet, um einen guten Überblick über die EPP und den darüber befindlichen Cortex zu erhalten. Die Auflösung dieser Aufnahmen betrug 1024x1024 Bildpixel. Für alle anderen Bildaufnahmen wurde eine 40-fache Vergrößerung eines Wasserimmersionsobjektivs ohne zusätzliche digitale Verstärkung gewählt, um gezielt die EPP darzustellen. In dieser Konfiguration wurden mehrere Schichtaufnahmen von 30-40 µm desselben Gewebeschnittes angefertigt (sog. Z-Stapel) und diese Z-Stapel zu einem 2-dimensionalen Bild fusioniert (maximum intensity projection). Folgende Anregungswellenlängen wurden verwendet: 488 nm zur GFP-Detektion (Argon-Laser), 561 nm zum Nachweis von Alexa 594 oder Cy3 (Helium/Neon-Laser) und 633 nm zur Darstellung von Alexa 647- oder Dylight 649-positiver Neuronen (Helium/Neon-Laser). DAPI wurde mit einer Wellenlänge von 405 nm (Diodenlaser) angeregt.

### **3.2.4. Quantifizierung der GFP-positiven Neuronen der endopiriformen Population**

Immunhistochemische Färbungen wurden an coronalen Gehirnschnitten durchgeführt. Dazu wurde jeder sechste Schnitt entnommen und gefärbt. Insgesamt wurden pro Färbereihe mindestens 10 Schnitte von je mindestens 3 Tieren verwendet.

Für die Auszählungen wurde eine Gitterstruktur entworfen, die zur Orientierung diente und sämtliche Aufnahmen der Schnitte im untersuchten Bereich in gleich große Abschnitte gliederte. Dieses Gitter wurde an jeder Hemisphäre manuell von der Piaoberfläche ausgehend bis zum Beginn der weißen Substanz über der EPP und den darüber liegenden cerebralen Cortex positioniert und die Zellzahlen für jedes Fenster getrennt ausgewertet. Dabei entsprach der innerste Teil (I) des Gitters etwa der EPP, die beiden darüber befindlichen (II, III) dem cerebralen Cortex. Zellzahlen für GFP und Somatostatin wurden jeweils getrennt bestimmt und im Anschluss doppel-positive Zellen für beide Marker gesucht. Unter 4.2.1. wurde das genaue Vorgehen beschrieben (siehe auch Abb. 7)

### **3.2.5. Bildauswertung**

Aufgenommene Abbildungen wurden im TIFF-Format digital gespeichert und mit Hilfe von Adobe Photoshop Version 10 ausgewertet. Bis auf Anpassung des Bildkontrastes und der Bildhelligkeit wurden durch das Programm keine Veränderungen an den Aufnahmen durchgeführt. Die Auszählungen erfolgten manuell.

Alle gewonnenen Daten wurden entweder als relative Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler oder als absolute Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung festgehalten. Statistische Tests wurden zur Analyse immunhistochemischer Daten nicht angewendet.

### 3.3. Morphologie

#### 3.3.1. Verwendete Antikörper und Färbemethoden

Zur Untersuchung der Morphologie wurde bei einem Teil der Zellen während der elektrophysiologischen Ableitungen Biocytin injiziert. Biocytin wurde in der Pipettenlösung (s.u.) gelöst (0,3-0,5%) und durch positive Strompulse aus den Patch-Clamp-Pipetten freigesetzt. Bei Biocytinkonzentrationen  $< 1\%$  genügten die Strompulse, die während der Zelleitungen zur Messung von elektrophysiologischen Parametern appliziert wurden, um Biocytin freizusetzen [Horikawa et al., 1988]. Am Versuchsende wurde die Patch-Clamp-Pipette erst vorsichtig zurückgezogen, um die Zellmembran nicht zu zerstören, und dann schnell aus dem Schnitt entfernt, um möglichst wenig Hintergrund in den späteren Aufnahmen zu verursachen. Schnitte mit Biocytin-markierten Neuronen wurden in 4% PFA (in PB) bei 4°C über Nacht gelagert.

Nach Fixation wurden die Schnitte zur Perforation der Zellmembran mindestens 6-fach in PB-T gewaschen und weitere 24 h gelagert. Vor Beginn der Immunfärbung wurden die Präparate für 2 Stunden in 5%-iger NGS in PB inkubiert, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Zur Darstellung der mit Biocytin gefüllten Zellen wurde Streptavidin Alexa 594 (Molecular Probes, Waltham, MA, S-11227) in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% NGS-haltiger PB den Schnitten hinzugefügt und die Schnitte in dieser Lösung für mindestens 12 Stunden inkubiert.

Die gefärbten Schnitte wurden wie oben beschrieben auf Objektträger übertragen, wobei nur ein Schnitt pro Objektträger aufgezogen wurde. Die Einbettung erfolgte auch hier mit einem auf MOWIOL basierenden Medium. Im Gegensatz zu den 30-40 µm dünnen Schnitten immunhistochemischer Färbungen wurde das 24x60 mm Deckglas hier zu beiden Seiten durch 18x18 Deckgläser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Abstandshalter unterstützt, um Quetschungen des 300 µm dicken Schnittes zu vermeiden.

Nach der Antikörperfärbung erfolgte die Bildaufnahme am Konfokalmikroskop. Übersichtsaufnahmen der Zelle wurden mit einem 10-fach vergrößernden Luftobjektiv bei einer digitalen Vergrößerung von 0,6 aufgenommen. Mithilfe eines 20-fach vergrößernden Wasserimmersionsobjektivs mit digitalem Vergrößerungsindex von 0,6-0,8 wurde die ganze Zelle in der XY-Ebene erfasst. Die Ausbreitung der Zelle in der dritten Ebene, der Z-Ebene (Tiefe des Gewebeschnitts), wurde unter manueller Durch-

sicht am Mikroskop überprüft und festgelegt. In XY-Ebene wurden Bilder im Abstand von 1-2  $\mu\text{m}$  aufgenommen (Erstellung von Z-Stapel) und durch eine Software überlagert (maximum intensity projection). Die Auflösung der Aufnahmen betrug 4098x4098 Bildpixel. Die Speicherung der Dateien erfolgte im TIFF-Format.

### **3.3.2. Morphometrische Analyse und statistische Verfahren**

Die Rekonstruktion Biocytin-markierter Zellen erfolgte mit Hilfe der Software NeuroLucida (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA). Die Konfokalbilder wurden dafür im TIFF-Format in das Programm eingelesen und die korrekte Voxeldimension angegeben. Zellkern, dendritische und axonale Zellfortsätze wurden manuell rekonstruiert.

Mithilfe des Analyseprogramms Neurolucida Explorer (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA) wurden die folgenden morphologischen Parameter der rekonstruierten Zellen bestimmt: Gesamtlänge aller Dendriten, Gesamtzahl aller dendritischen Knotenpunkte, maximaler Verzweigungsgrad des dendritischen Baums, Zahl der dendritischen Primärprozesse und Gesamtfläche aller Dendriten. In Sholl-Analysen [Sholl, 1953] wurden außerdem in 20  $\mu\text{m}$  Radien die Länge dendritischer und axonaler Prozesse pro Sektor sowie die Anzahl dendritischer und axonaler Knotenpunkte pro Sektor bestimmt.

Zur Datenanalyse und statistischen Auswertung wurden die Programme Igor Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) und Prism 3 (Graphpad Software, San Diego, USA) verwendet. Absolute Messwerte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD), normalisierte Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

Für die statistische Auswertung wurden je nach Datenlage folgende Tests angewendet: der gepaarte (verbundene) t-Test (2 Stichproben, parametrisch), One-way ANOVA und ANOVA für wiederholte Messungen mit Bonferronis multiplen Post-Tests, der nicht parametrische Mann-Whitney Test und der Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn. Daten, die einen  $p$ -Wert kleiner als  $p < 0,05$  aufwiesen, wurden als signifikant gewertet (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.4. Elektrophysiologie

#### 3.4.1. Perfusionslösungen

Alle elektrophysiologischen Versuche wurden an Gehirnschnitten *in vitro* durchgeführt. Um die Stoffwechselaktivität des neuronalen Gewebes aufrechtzuerhalten, wurden die Präparate während der Inkubation und der Messungen ständig mit artifizier cerebrospinaler Flüssigkeit („*artificial cerebrospinal fluid*“; ACSF) perfundiert (siehe Tab. 3).

Substanz	Summenformel	Konz. [mM]
Natriumchlorid	NaCl	125
Kaliumchlorid	KCl	3
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	25
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	2
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	2
D-Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	25

Tabelle 3: Zusammensetzung der ACSF

Für die Schnittpräparation wurde eine Lösung (Schneidelösung) mit anderer Zusammensetzung verwendet (Tab. 4). Wichtig war der Unterschied in der Konzentration von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und Na<sup>+</sup>-Ionen: Man geht davon aus, dass durch eine erniedrigte Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen die neuronale Erregbarkeit herabgesetzt wird [Tanaka et al., 2008]. Dadurch verringert sich die Gefahr der Exzitotoxizität und der Auslösung von epilepsieartigen Entladungen infolge der Traumatisierung durch die Präparation deutlich.

Beide Lösungen wurden zu jedem Zeitpunkt mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begast. Dadurch wurde zum einen die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet. Außerdem bildeten CO<sub>2</sub> und NaHCO<sub>3</sub> ein offenes Puffersystem, das zusammen mit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> den pH-Wert bei 7,4 (28°C) konstant hielt. Die hohe Konzentration an D-Glucose von 25 mM (in vivo ca. 5 mM) stellte auch unter in vitro-Bedingungen sicher, dass der Energiestoffwechsel der Zellen nicht eingeschränkt wurde.

Substanz	Summenformel	Konz. [mM]
N-Methyl-D-Glucamin	$C_7H_{17}NO_5$	135
Kaliumchlorid	KCl	1,5
Natriumdihydrogenphosphat	$NaH_2PO_4$	1,5
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	23
Calciumchlorid	$CaCl_2$	0,5
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	3,5
Ascorbinsäure	$C_6H_8O_6$	0,4
D-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	25

Tabelle 4: Zusammensetzung der Schneidelösung

### 3.4.2. Intrazellulärlösung

Substanz	Summenformel	Konz. [mM]
Kaliumgluconat	$C_6H_{11}KO_7$	135
Kaliumchlorid	KCl	4
Natriumchlorid	NaCl	2
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	0,2
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	10
Magnesium-ATP	$C_{10}H_{14}MgN_5O_{13}P_3$	4
Natrium-GTP	$C_{10}H_{14}N_5O_{14}P_3Na_2$	0,5
Phosphokreatin	$C_4H_{10}N_3O_5P$	10

Tabelle 5: Zusammensetzung der Intrazellulärlösung

Da die Messungen in der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp Technik durchgeführt wurden, enthielten die verwendeten Glaselektroden eine Lösung, die den Ionenverhältnissen des intrazellulären Milieus ähnelte (Tab. 5). Der pH-Wert der Lösung lag bei 7,3; die Osmolarität bei 290 mOsm.

HEPES (siehe Tab. 5) diente als Puffer zur Konstanthaltung des intrazellulären pH-Werts und der Calcium-Chelator EGTA (siehe Tab. 5) sorgte für geringe intrazelluläre Calciumkonzentrationen. Magnesium-ATP (Adenosintriphosphat) und Natrium-GTP (Guanosintriphosphat) wurden als Energielieferanten und zur Aufrechterhaltung von Second-Messenger-Systemen beigesetzt. Phosphokreatin war zur Rephosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) notwendig. Dadurch konnte der sogenannte „Run-down“ von intrinsischen und Ligandengesteuerten Membranleitfähigkeiten verhindert werden.

### 3.4.3. Präparation der Hirnschnitte

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche GIN-Mäuse im Alter von 17 - 37 Tagen verwendet. Vor Beginn der Präparation wurden die Tiere in einer Narkosekammer durch Inhalation von CO<sub>2</sub> betäubt. Nach Erreichen eines Toleranzstadiums, das sich durch Ausfall der Stell- und Haltere reflexe, vertiefte Atmung und fehlende Cornealreflexe auszeichnete, erfolgte die Dekapitation. Der Kopf wurde für 30 Sekunden in eisgekühlte Schneidelösung getaucht. Die kältebedingte Vasokonstriktion führte zum „Auspressen“ eines Großteils des verbliebenen Blutes. Nach Entfernung von Kopfhaut und Schädeldecke wurde das Gehirn im Ganzen entnommen und für 60 Sekunden in eisgekühlter Schneidelösung gelagert. Im Anschluss wurde das Cerebellum manuell mit einer Rasierklinge entfernt und die beiden Hemisphären durch einen Schnitt entlang der Fissura longitudinalis getrennt. Eine Hälfte wurde als Reserve in der Schneidelösung aufbewahrt. Bei der anderen Hälfte wurde durch zwei coronale Schnitte der caudale und rostrale Pol entfernt. An der entstandenen caudalen Fläche wurde das Gewebepreparat mithilfe von Cyanoacrylat-Klebstoff (LockTite 406, Henkel, Düsseldorf, Deutschland) auf einer Metallplatte aufgeklebt. Ein zuvor auf dem gleichen Träger befestigter Agarblock stabilisierte die mediale Seite der präparierten Hemisphäre.

Die Metallplatte wurde dann in die Kammer eines Vibratoms (HM650V, MICROM International; Walldorf; Deutschland) eingesetzt. Bei langsamer Vorschubgeschwindigkeit und mittlerer Vibrationsfrequenz wurden 6-8 coronale Schnitte mit einer Dicke von 300 µm angefertigt. Die Wanne des Vibratoms war dabei mit 4°C kühler Schneidelösung gefüllt und wurde kontinuierlich begast.

Die präparierten Schnitte wurden in ACSF gesammelt und zur Erholung erst für 30 Minuten bei 28°C im Wärmebad und daraufhin für mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die Schnitte in die Messkammer übertragen werden.

#### **3.4.4. Aufbau des Messsystems**

Die akuten Schnitte wurden in ein Organbad unter einem aufrechten Durchlicht-Mikroskop (Axioskop FS; Zeiss; Göttingen, Deutschland) gelegt. Diese Ableitkammer wurde mithilfe einer peristaltischen Pumpe (Minipuls 3; Gilson; Middleton, USA) ständig mit Carbogen-begaster ACSF perfundiert (Flussrate 3 ml/min). Ein Temperaturregler (TC-324B Temperature Controller; Warner Instrument Corporation; Connecticut, USA) erwärmte die Lösung vor Erreichen der Kammer auf ca. 28°C. Um Bewegungen des Schnittes im Organbad aufgrund der Strömung zu verhindern, wurde er fixiert durch einen mit Nylonfäden bespannten Metallring.

Zur Darstellung zellulärer Strukturen im Präparat war das Mikroskop mit einer Infrarot-fähigen Differenzial-Interferenz-Kontrast (DIC)- und einer Epifluoreszenz-Optik ausgestattet (Filter: Zeiss BP450-490, LP520). Die DIC-Technik erlaubte es, lokale Variationen optischer Wellenlängen im Präparat zu erfassen und diese als Helligkeitsunterschiede einer Phasenkontrastaufnahme darzustellen. In Kombination mit Infrarot-Licht konnten Neurone bis zu einer Tiefe von ca. 150 µm visuell dargestellt und identifiziert werden [Dodt et al., 1990]. GFP-positive Neurone wurden zusätzlich anhand ihrer Fluoreszenz nachgewiesen, indem Licht zwischen 460 und 500 nm Wellenlänge auf das Präparat gestrahlt wurde. Durch eine infrarotsensitive CCD-Mikroskopkamera (Orca-ER, Hamamatsu, Shizouka, Japan) konnten Bilder auf einen LCD-Monitor abgebildet und digital gespeichert werden (Software: Axiovision Rel. 4.4, Zeiss, Göttingen, Deutschland).

#### **3.4.5. Ableitelektroden**

Die Elektroden für intrazelluläre Messungen wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,86 mm; Hugo Sachs Elektronik-



Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany) mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried, Deutschland) hergestellt und mit je 20  $\mu$ l Intrazellulärlösung gefüllt. Das im Inneren der Elektrode befindliche Glasfilament erleichterte die direkte anterograde Füllung der Spitze. An jedem Versuchstag wurden neue Elektroden verwendet. Der elektrische Widerstand der Kapillaren in der Badlösung betrug zwischen 4-9 M $\Omega$ .

Entsprechend präparierte Pipetten wurden in den Elektrodenhalter eines motorisierten Mikromanipulators (LN mini 25; Luigs & Neumann; Ratingen, Deutschland) eingespannt. Durch einen mit Silberchlorid (AgCl) überzogenen Silberdraht entstand eine Verbindung zum Vorverstärker. Da sich die AgCl-Schicht im Verlauf eines Versuchstages verbrauchte, wurde sie an jedem Versuchstag durch Elektrolyse in NaCl (1 M) neu chloriert. Als Referenzelektrode diente ein Ag/AgCl-Pellet, das in die ACSF des Organbads eingetaucht war. Weil die Glaselektrode im Elektrodenhalter luftdicht angeschlossen wurde, konnte über ein externes Schlauchsystem mit einer aufgesetzten 1 ml Spritze Überdruck oder Unterdruck in der Pipette erzeugt werden.

### 3.4.6. Messverfahren

Bei Eintauchen der Elektrode in die Badlösung wurde ein leichter Überdruck angelegt, um Verschmutzungen der Elektrodenspitze durch Gewebepartikel zu vermeiden. Gleichzeitig konnte Gewebe in der Umgebung der ausgewählten Zelle „*weggewaschen*“ werden.

Die Elektrode wurde unter Sichtkontrolle bei 40-80-facher Vergrößerung an den Schnitt herangefahren. Die unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Ionen in der Intrazellulärlösung der Pipette und der Extrazellulärlösung im Organbad bewirkten eine Potenzialdifferenz („*offset*“ oder Liquid Junction Potential), die am Verstärker abgeglichen wurde. Der Elektrodenwiderstand wurde im Current-Clamp Modus mittels einer aktiven Brückenschaltung bestimmt und kompensiert.

Die Bildung des sogenannten „*Gigaseals*“ und das Durchbrechen der Zellmembran erfolgten im Voltage-Clamp-Modus. Dazu wurde die Elektrode im Gewebe wenige Mikrometer oberhalb der Zelle platziert und ein Rechtecksspannungspuls von +5 mV appliziert. Das dadurch induzierte Stromsignal zeigte den Zugangswiderstand der Zelle an. Der Überdruck wurde entfernt und die Pipette so nah an das Neuron heran-

gefahren, dass ein Eindellen der Zellmembran (sog. „*Dimpling*“) zu sehen war. Außerdem kam es dabei bereits zu einer Widerstandszunahme (Abnahme der Amplitude des Stromsignals). Durch Applikation eines leichten Unterdrucks wurde anschließend ein kleiner Membranfleck (Patch) in die Elektrodenspitze eingesogen (Cell-attached-Konfiguration). Als Folge der festen Verbindung zwischen Pipetteninnenseite und Zellmembran entstand ein Zugangswiderstand im Giga-Ohm-Bereich (Gigaseal).

Da sämtliche Ableitungen im Rahmen dieser Arbeit in der Ganzzell-Konfiguration stattfanden, wurde der in der Pipette eingeschlossene Membranfleck durch leichtes Saugen aufgerissen. Dadurch entstand eine direkte Verbindung zwischen Ableitelektrode und Zellinnerem. Bei gut erhaltenem Seal waren Leckströme und Hintergrundrauschen gering.

Bei dem Messverstärker handelte es sich um einen Patch-Clamp Verstärker (npi ELC-03XS, Fa. npi electronics, Tamm, Deutschland), der sowohl im Voltage-Clamp- als auch im Current-Clamp-Modus betrieben werden konnte. Alle im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Messungen erfolgten im Current-Clamp-Modus. Elektroden- und Zellzugangswiderstände wurden in der Ganzzell-Konfiguration mit einer geeigneten Widerstandskombination kompensiert, um intrazelluläre Ableitungen unabhängig von diesen Widerständen zu ermöglichen. Die Messungen wurden mit 20 kHz gefiltert und für die Computer-gestützte Registrierung mit 10-20 kHz digitalisiert. Die Experimente und Speicherung der Daten erfolgte mittels des Programms CellWorks (npi electronic, Tamm, Deutschland).

### **3.4.7. Auswertung elektrophysiologischer Daten und statistische Verfahren**

Zur Datenanalyse und statistischen Auswertung wurden die Programme Igor Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) und Prism 3 (Graphpad Software, San Diego, USA) verwendet. Absolute Messwerte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD), normalisierte Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

Folgende Messwerte wurden bestimmt: Ruhemembranpotenzial (RMP), somatische Membranzeitkonstante, Zelleingangswiderstand ( $R_N$ ), Zellkapazität, Amplitude, Dau-

er, Anstiegs- und Abfallszeit des Aktionspotenzials (AP), Amplitude des sog. „Sag“-Potenzials, Zeitintervall bis zum „Sag“-Maximum, Rektifikationskoeffizient der Strom-Spannungsbeziehung, Interspike-Intervall (ISI) zwischen erstem und zweitem AP ( $ISI_1$ ), zwischen zweitem und drittem AP ( $ISI_2$ ), zwischen den APs bei Entladung im Gleichgewichtszustand ( $ISI_{stst}$ ) und zwischen allen APs, Adaptationsindex und -Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial.

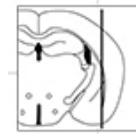
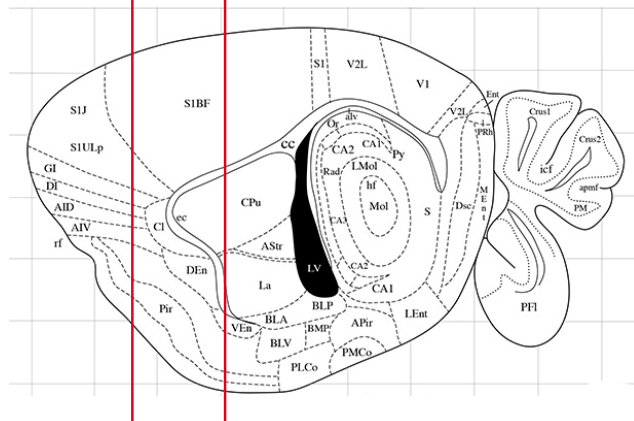
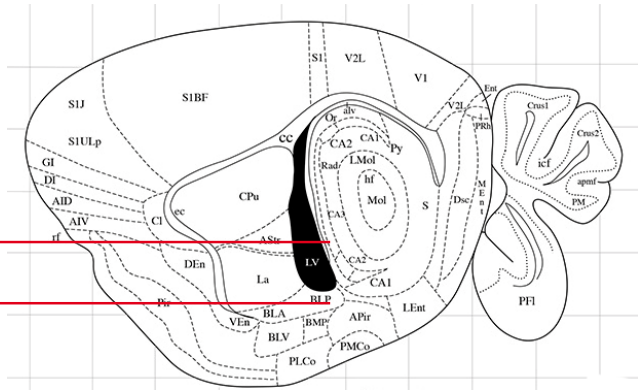
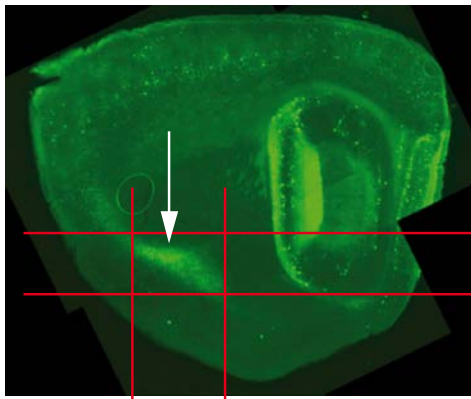
Für die statistische Auswertung wurden je nach Datenlage folgende Tests angewendet: der gepaarte (verbundene) t-Test (2 Stichproben, parametrisch), One-way ANOVA und ANOVA für wiederholte Messungen mit Bonferronis multiplen Post-Tests, der nicht-parametrische Mann-Whitney Test und der Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn. Daten, die einen  $p$ -Wert kleiner als  $p < 0,05$  aufwiesen, wurden als signifikant gewertet (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Lokalisation und Verteilung der GFP-positiven Neurone in der endopiriformen Population

Die untersuchten GFP-positiven Neurone grenzten sich nach lateral vom piriformen Cortex und medial von der weißen Substanz ab. In einer Übersichtsaufnahme (Abb. 4 und 5) wurde die Neuronenpopulation medial des piriformen Cortex abgebildet und konnte anhand der beigefügten Atlasaufnahmen dem Kerngebiet des Nucleus endopiriformis und möglicherweise auch dem Claustrums zugeordnet werden. Wie deutlich zu sehen, hob sich das GFP-Expressionsmuster in der EPP eindeutig vom Hintergrundrauschen der Umgebung ab und konnte als fortlaufende Struktur in verschiedenen Ebenen (coronal in Abb. 4, sagittal und horizontal in Abb. 5) dargestellt werden. In Abbildung 6 wurde die Population nochmals in größerem Detail dargestellt. Die Identifikation der in dieser Arbeit untersuchten Neurone orientierte sich an dem lokal deutlich höheren GFP-Gehalt im Vergleich zur Umgebung. Da der Hauptanteil dieser GFP-Expression mit dem Kerngebiet des Ncl. endopiriformis übereinzustimmen schien (vgl. Abbildung 4 und 5), wurde der Begriff endopiriforme Population (EPP) für die weitere Beschreibung der Eigenschaften dieser Neuronengruppe gewählt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit bezeichneten GIN GFP- und SOM-positive Interneurone des Neocortex und Hippocampus, während der Begriff GFP-positive/s Neuron/e für Zellen der EPP verwendet wurde.

A



Lateral: 3.25 mm

*Cl* = *Clastrum**DEn* = *Ncl. endopiriformis dorsalis*

B

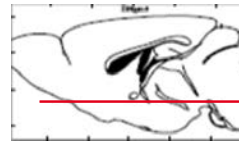
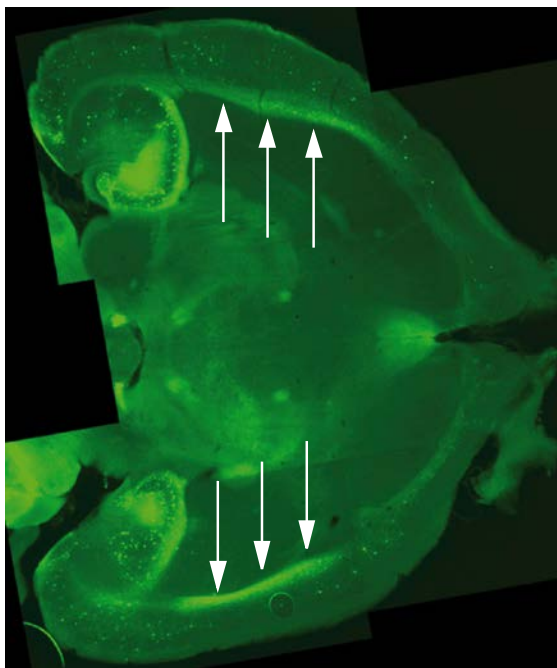
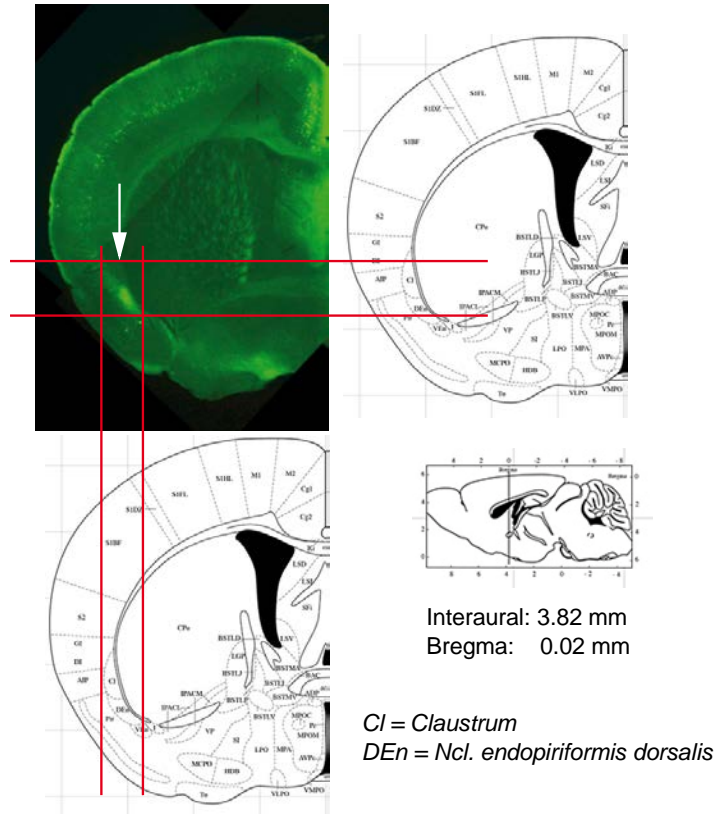


Abbildung 4: Anatomische Zuordnung der endopiriformen Population (EPP) anhand einer sagittalen und horizontalen Schnittführung. Sagittale Epifluoreszenzaufnahme (A, links oben) der EPP (Markierung mit weißem Pfeil, links) mit Vergleichsaufnahmen (rechts und unten) aus dem „*Mouse Brain Atlas*“ von Franklin und Paxinos [2012]. Horizontale Epifluoreszenzaufnahme (B, links) der endopiriformen Population (Markierung der EPP mit weißen Pfeilen, links) mit Darstellung der Schnittebene (rechts) aus dem „*Mouse Brain Atlas*“ von Franklin und Paxinos (2012).

A



B

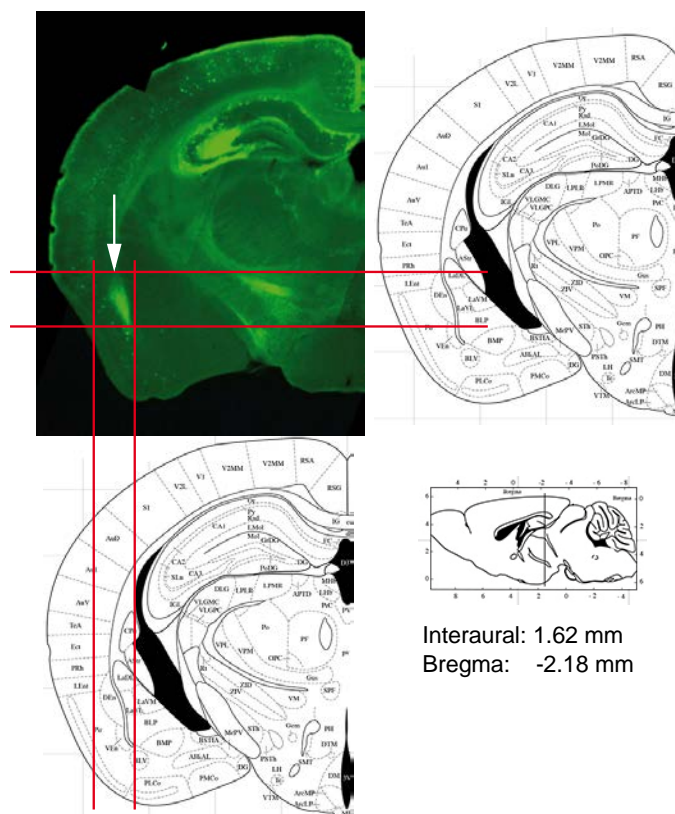


Abbildung 5: Anatomische Zuordnung der endopiriformen Population (EPP) anhand einer coronaler Schnittführung. Dargestellt ist je eine Hemisphäre der GIN-Maus als Epifluoreszenzaufnahme (A und B, links oben) in zwei unterschiedlichen Schnitttiefen mit der jeweiligen Vergleichsebene aus dem „Mouse Brain Atlas“ von Franklin und Paxinos [2012]. Anhand der Vergleichslinien (rot) zwischen der GFP-positiven Neuronenpopulation und den Atlasaufnahmen erfolgte die Zuordnung der Zellgruppe hauptsächlich zum Ncl. endopiriformis, möglicherweise auch zu Teilen dem Claustrum.



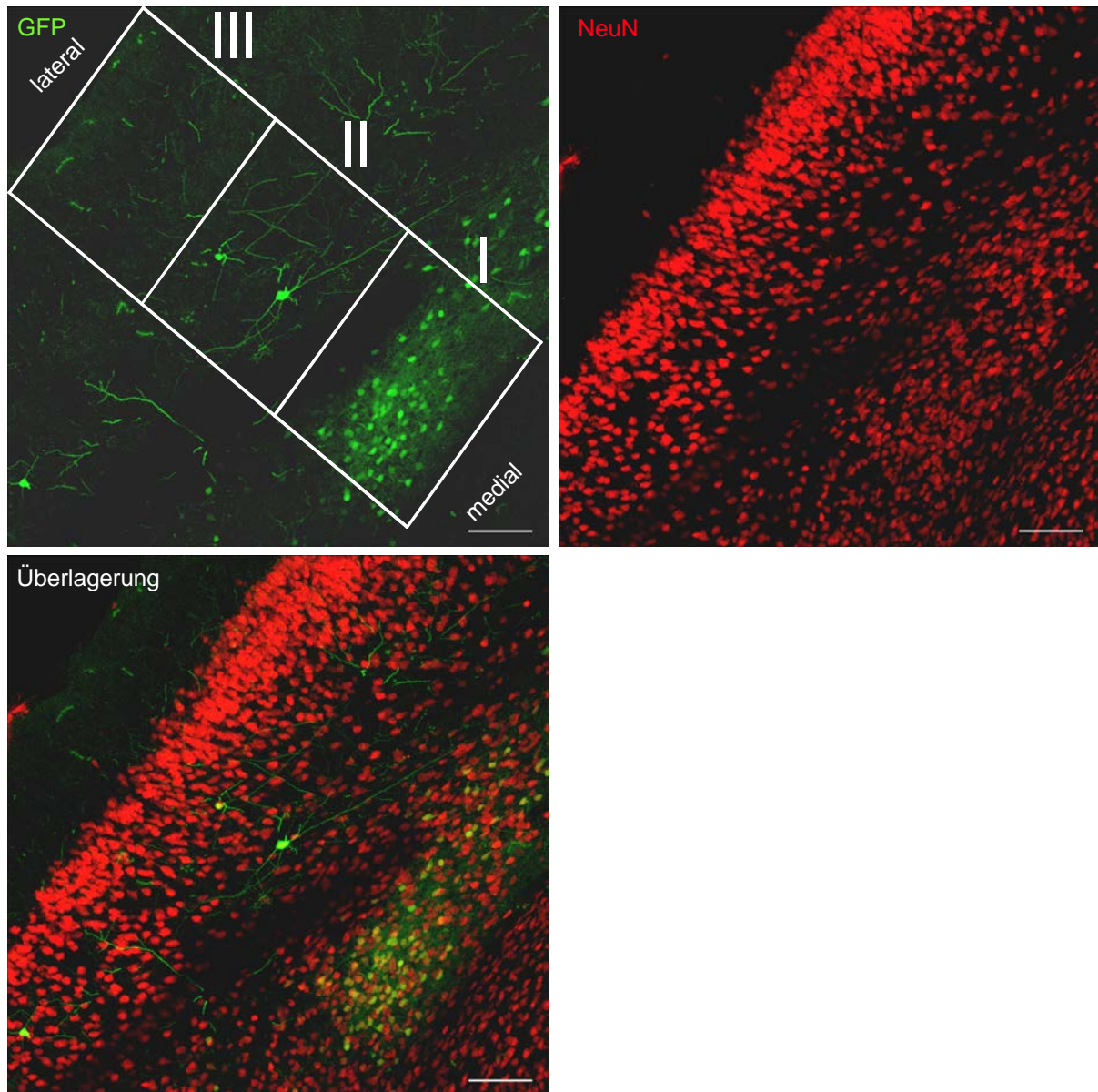


Abbildung 6: Übersichtsaufnahme der endopiriformen Population (EPP). Konfokale Nahaufnahme der EPP einschließlich des darüber liegenden piriformen Cortex (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ). Darstellung einer GFP-Färbung (oben links), einer NeuN-Färbung (oben rechts) und der Überlagerung beider Aufnahmen (unten rechts). Zytoarchitektonischer Aufbau des piriformen Cortex und des darunter befindlichen Kerngebietes ist erkennbar. Nach lateral stellt sich die Piaoberfläche dar, nach medial die weiße Substanz.

## 4.2. Neurochemisches Profil der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population

### 4.2.1. GFP-Verteilung

Zunächst wurde die reine Verteilung der GFP-positiven Zellen in der EPP im Vergleich zum darüber befindlichen piriformen Cortex ausgewertet. Dazu wurde eine Gitterstruktur aus drei gleichen Anteilen entworfen (Abb. 7).

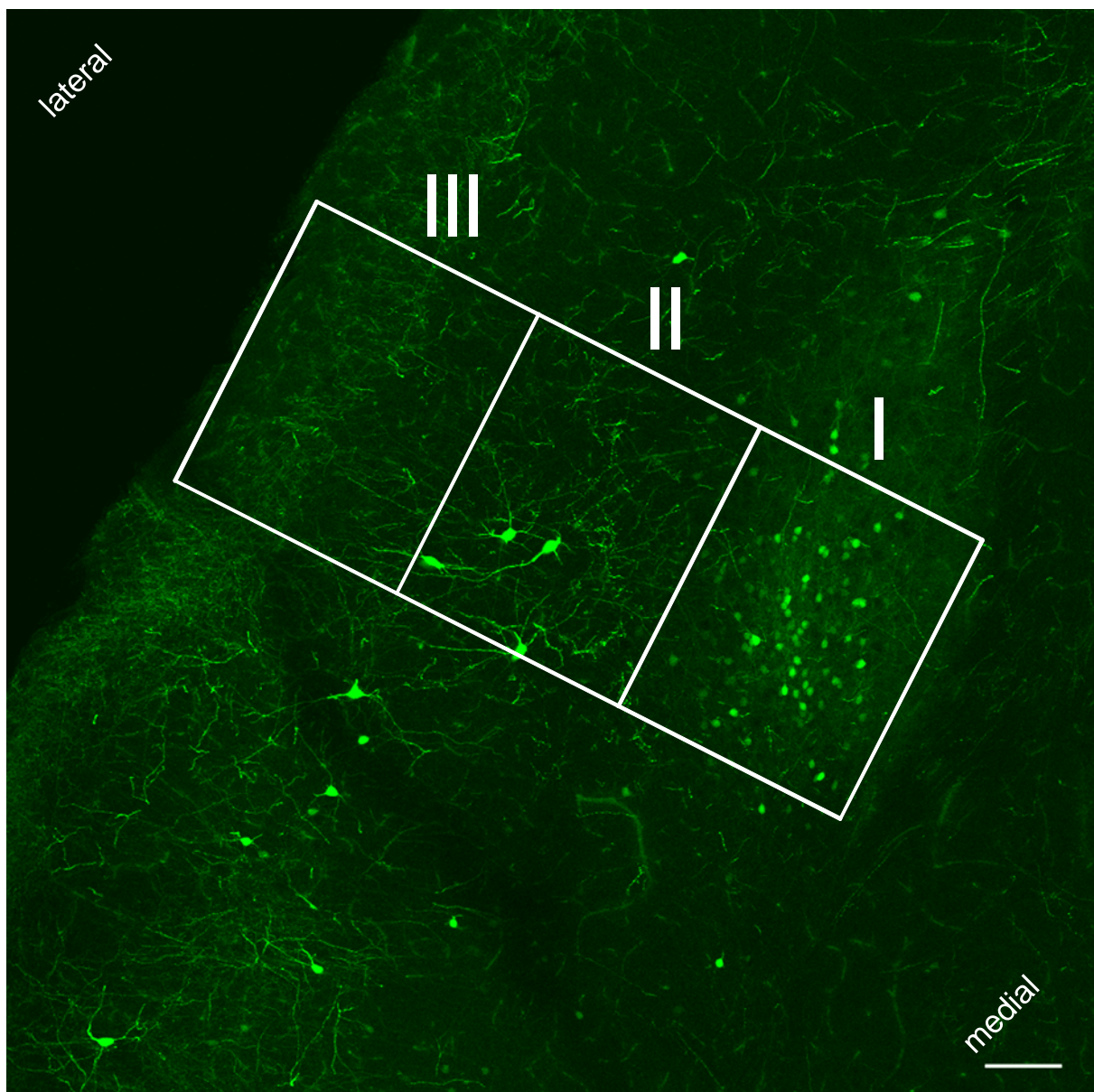


Abbildung 7: Darstellung der endopiriformen Population (EPP) mit dem verwendeten Raster für immunhistochemische Zählungen. Konfokale Aufnahme GFP-positiver Neurone in der EPP und dem piriformen Cortex. Anhand der Gitterstruktur (weiß) erfolgten die immunhistochemische Auswertung zur Bestimmung der Zellzahlen in den Sektoren I (mediales Fenster/EPP), II und III (medianes und laterales Fenster/piriformer Cortex). Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ .



Für jede Abbildung eines Gewebeschnitts wurde das Gitter manuell über der EPP eingefügt. Das Verhältnis der drei Sektoren zueinander blieb dabei immer gleich, um eine standardisierte Auswertung zu ermöglichen. Das Gitter überdeckte jeweils den Bereich von der Piaoberfläche des piriformen Cortex bis zum Beginn der weißen Substanz medial der EPP.

Insgesamt wurden 11802 GFP-positive Neurone (je mind. 10 Schnitte; 10 Mäuse) in allen drei Bereichen ausgezählt, davon fanden sich  $87,1\% \pm 1,0$  SEM in der EPP (i.e. in Sektor I)  $12,4\% \pm 1,1$  SEM im piriformen Cortex (Sektor II) und nur  $0,5\% \pm 0,1$  SEM in Sektor III (Abb. 8 A).

Während im piriformen Cortex GFP-exprimierende Neurone im Vergleich zur EPP nur spärlich vorhanden waren, zeichneten sie sich dort durch größere Somata und eine stärkere Immunfluoreszenz aus (vgl. Abb. 6 und 7). Diese Beobachtung wurde bei Begutachtung von Gewebeschnitten wiederholt festgestellt, jedoch nicht quantifiziert.

#### **4.2.2. Verteilung der SOM-positiven Interneurone**

Da GFP-exprimierende Neurone in der GIN-Maus eine Untergruppe der Somatostatin-positiven Interneurone bilden, wurde die SOM-Expression in der EPP und dem darüber befindlichen piriformen Cortex untersucht. Damit konnte die Verteilung SOM-positiver Neurone im Vergleich zu den GFP-positiven Neuronen und deren Verhältnis zueinander ermittelt werden.

Insgesamt wurden 2524 SOM-positive Neurone ausgezählt (je 10 Gewebeschnitte bei 5 Mäusen). Diese zeigten folgendes Verteilungsmuster:  $53,0\% \pm 1,3$  SEM in Sektor I,  $43,8\% \pm 1,2$  SEM in Sektor II und  $3,3\% \pm 0,4$  SEM in Sektor III (Abb. 8 B). In rostro-kaudaler Orientierung wurden keine Unterschiede in der Verteilung der SOM-positiven Interneuronen festgestellt.

SOM-exprimierende Neurone waren also in der EPP (Sektor I) und Schicht II/III piriformen Cortex (Sektor II) ähnlich verteilt. In der anatomischen Cortexschicht I (Sektor III) fanden sich wenige SOM-positive Zellen (Abb. 8 B).

#### **4.2.3. Coexpression von Somatostatin in GFP-positiven Neuronen**

Im nächsten Schritt wurde der Prozentsatz derjenigen GFP-positiven Zellen von allen GFP-positiven Neuronen der EPP bestimmt, die gleichzeitig SOM exprimierten. Die Auswertung dieses Experimentes führte zu folgendem überraschenden Ergebnis: eine Coexpression von SOM wurde nur in  $0,3\% \pm 0,1$  SEM der GFP-positiven Zellen im Sektor I gefunden. In Sektor II waren  $11,8\% \pm 1,4$  SEM und in Sektor III waren  $80,3\% \pm 2,6$  SEM aller GFP-positiven Zellen auch SOM-positiv (Abb. 8 C).

Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, als alle bisher untersuchten GIN in der Literatur als eine Untereinheit der SOM-positiven Interneurone beschrieben worden waren [Oliva et al., 2000].

#### **4.2.4. Coexpression von GFP in SOM-positiven Neuronen**

Genauso wurde das Verhältnis der SOM-exprimierenden Neurone, die gleichzeitig GFP-positiv waren, zur Anzahl aller SOM-positiven Neurone bestimmt (Abb. 8 D): in Sektor I (d.h. in der EPP) exprimierten nur  $1,8\% \pm 0,4$  SEM aller SOM-positiven Zellen auch GFP. In Sektor II waren es  $13,2\% \pm 3,2$  SEM und in Sektor III  $37,3\% \pm 6,4$  SEM.

Das Ergebnis der Teiluntersuchungen in den Kapiteln 3.2.3 und 3.2.4 legte nahe, dass die GFP-exprimierenden Neurone der EPP sich im Hinblick auf die Coexpression von Somatostatin deutlich von GIN unterscheiden.

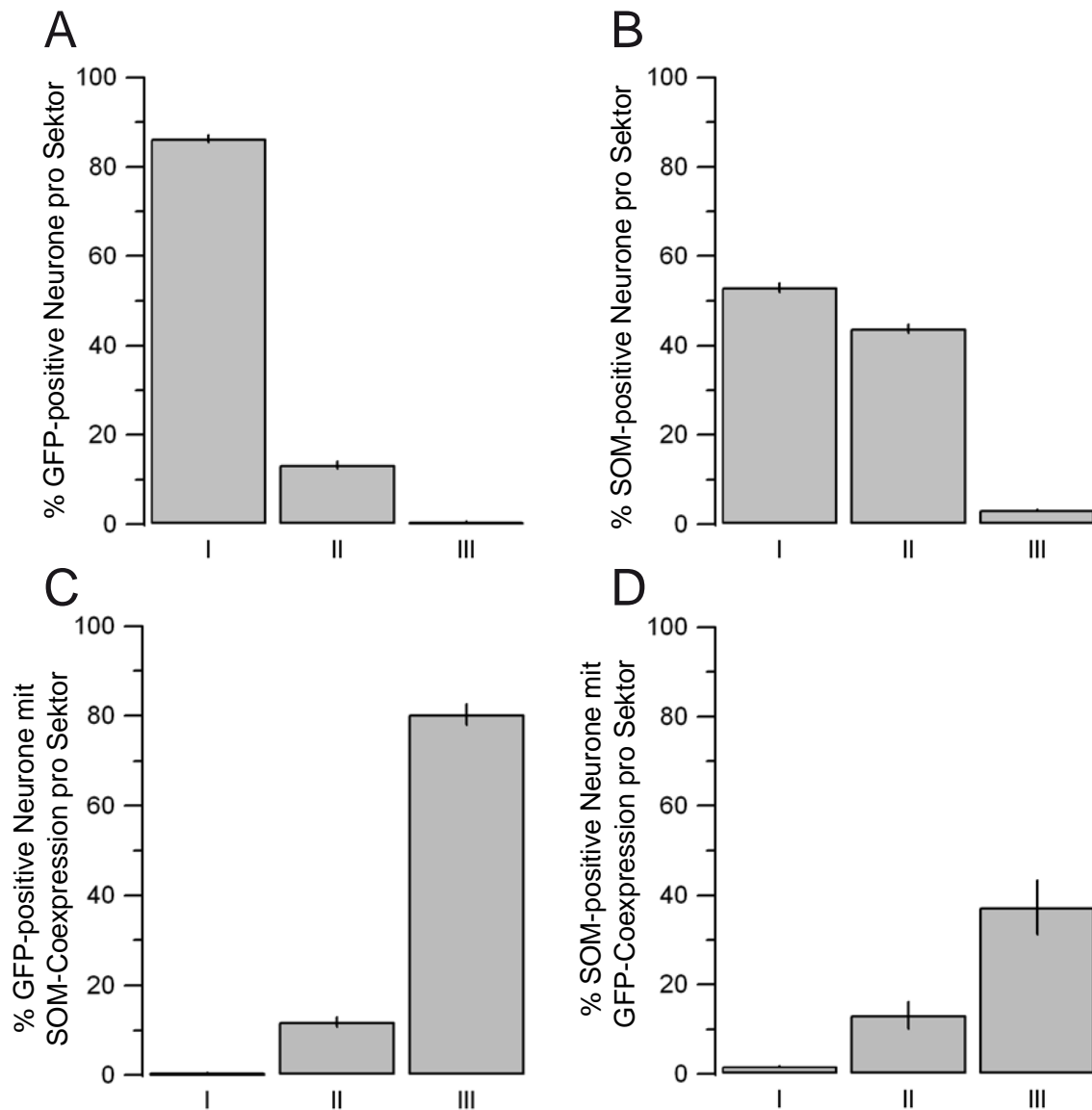


Abbildung 8: Darstellung der Verteilung von GFP (A) und SOM (B) in den Sektoren I (endopiriforme Population), II und III (piriformer Cortex) sowie Coexpression beider Marker bezogen auf die Gesamtmenge aller GFP-positiven Neurone (C) und auf die Gesamtmenge aller SOM-positiven Neurone (D).

A) Graphische Darstellung der Verteilung GFP-positiver Neurone in den Sektoren I, II und III in Prozent mit SEM als Blockdiagramm.

B) Graphische Darstellung der Verteilung Somatostatin-positiver Neurone in den Sektoren I, II und III in Prozent mit SEM als Blockdiagramm.

C) Verteilung aller GFP-positiven Neurone in den Sektoren I, II und III, die zusätzlich den Marker SOM exprimieren in Prozent mit SEM als Blockdiagramm.

D) Verteilung aller SOM-positiven Neurone in den Sektoren I, II und III, die zusätzlich den Marker GFP exprimieren in Prozent mit SEM als Blockdiagramm.

#### 4.2.5. Coexpression von GFP-positiven Zellen mit Parvalbumin

Da in der EPP keine SOM-Coexpression in GFP-positiven Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob es sich bei diesen Zellen möglicherweise um Parvalbumin (PV)-exprimierende Interneurone handeln könnte.

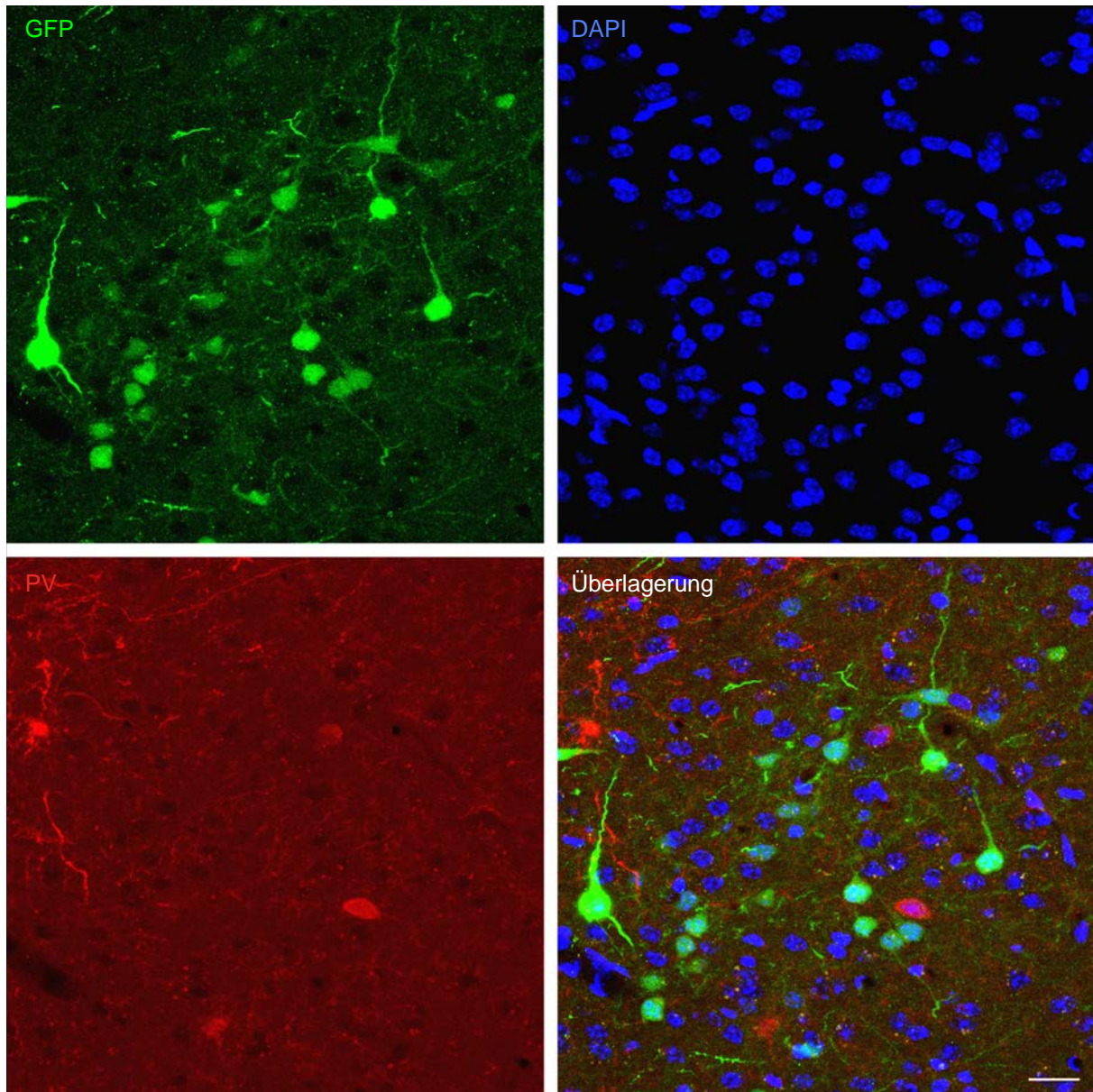


Abbildung 9: Darstellung der Coexpression von GFP, PV und DAPI in der endopiriformen Population (EPP). Konfokale Nahaufnahme einer GFP-Färbung (oben links), einer DAPI-Färbung (oben rechts), einer PV-Färbung (unten links) und der Überlagerung aller Einzelbilder (unten rechts). In allen ausgewerteten Abbildungen konnte keine Coexpression von GFP und PV festgestellt werden. Maßbalken 20  $\mu\text{m}$ .

Alle nachfolgenden Ergebnisse wurden aus 40-fach vergrößernden Aufnahmen gewonnen und beziehen sich nur noch auf die EPP (mind. 10 Schnitte bei 4 Tieren). Dazu wurden GFP-positive Neurone in der EPP ausgezählt und auf ihre Coexpression mit dem Marker PV untersucht. In dieser Zählung konnte bei 612 GFP-exprimierenden Neuronen keine Coexpression mit PV-positiven Neuronen festgestellt werden (vgl. Abb. 9).

#### 4.2.6. Immunreaktivität für GAD65/67

Aufgrund der fehlenden Coexpression von Somatostatin oder von Parvalbumin in GFP-positiven Neuronen der EPP folgten immunhistochemische Färbungen zur Überprüfung der Coexpression von GFP mit GAD65/67 und SOM (je mind. 10 Gewebeschnitte bei 4 Tieren).  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) wird durch die Glutamat-Decarboxylase aus Glutamat gewonnen und ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter. Hauptsächlich verantwortlich dafür sind die beiden Isoformen der Glutamat-Decarboxylase GAD65 und GAD67, die von den zwei verschiedenen Genen *Gad1* und *Gad2* kodiert werden [Bu et al., 1994].

In der EPP exprimierte eine Minderheit von  $1,5\% \pm 0,4$  SEM aller GFP-positiven Neurone auch GAD65/67. Der weitaus größte Teil zeigte überraschenderweise keine Immunreaktivität für GAD65/67 ( $98,6\% \pm 0,3$  SEM). Hingegen zeigten SOM-positive Neurone der EPP in  $96,2\% \pm 1,1$  SEM der Fälle auch eine Immunreaktivität für GAD65/67 (siehe auch Tab. 6). Diejenigen GFP-positiven Neurone, die SOM coexprimierten, zeigten zu 99% auch eine GAD65/67-Expression. „Echte“ GIN konnten damit durchaus in der EPP nachgewiesen werden. Die weit überwiegende Mehrheit bestand allerdings aus GFP-positiven Neurone, die weder für SOM noch für GAD65/67 eine Immunreaktivität zeigten. Abb. 10 und 11 zeigen entsprechende Aufnahmen: GFP-positive Neurone der EPP exprimierten kein SOM und waren GAD-negativ. Das SOM-positive Neuron in der EPP war auch GAD-positiv (Abb. 10, weißer und roter Pfeil). Eine Vergleichsaufnahme aus dem piriformen Cortex (Abb. 11) zeigte die SOM- und GAD65/67-Coexpression beider dargestellter GIN.



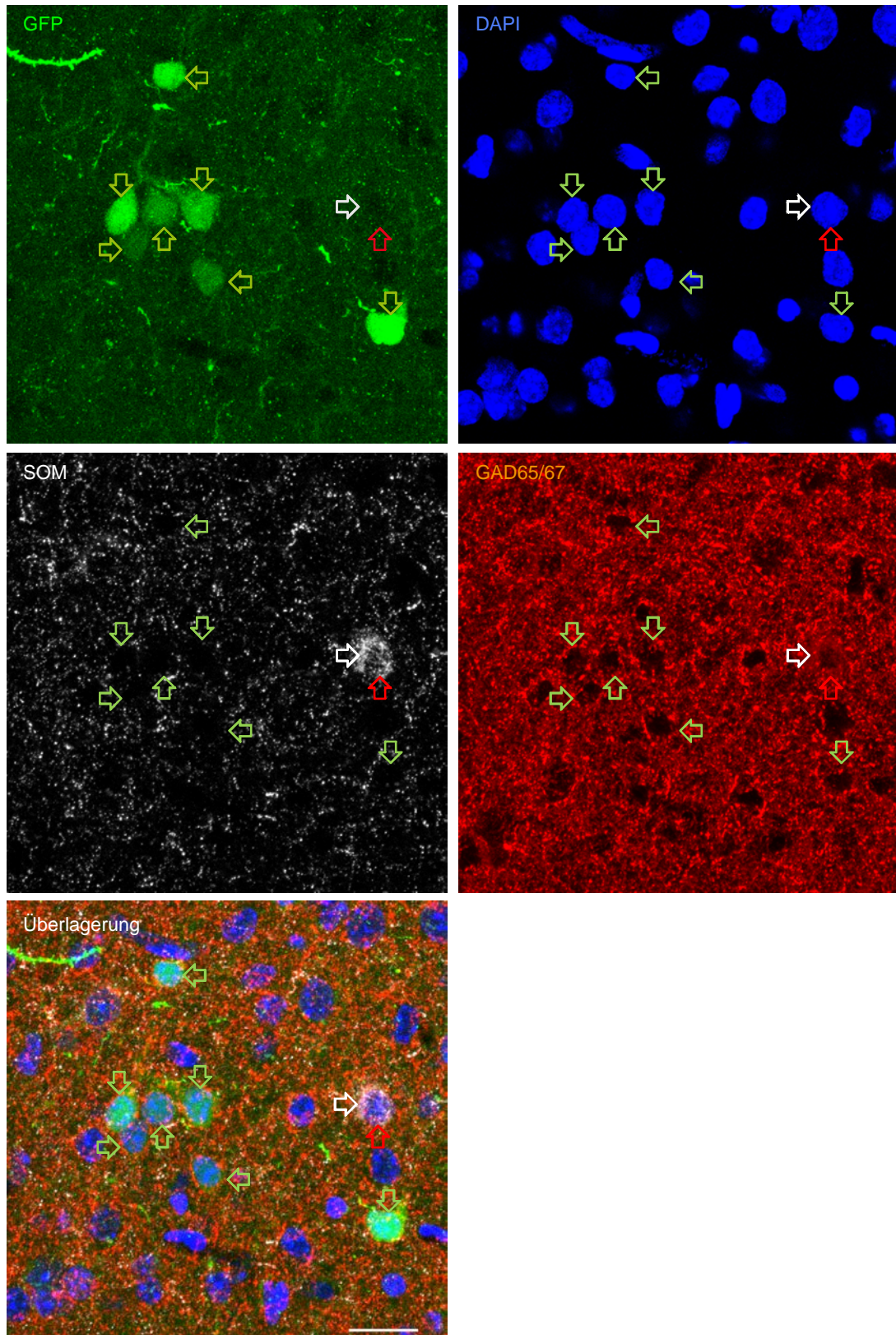


Abbildung 10: Coexpression von GFP, SOM, GAD65/67 und DAPI in der endopiriformen Population (EPP). Konfokale Nahaufnahme einer GFP-Färbung (oben links), einer DAPI-Färbung (oben rechts), einer SOM-Färbung (Mitte links), einer GAD65/67-Färbung (Mitte rechts) und der Überlagerung aller Einzelaufnahmen. Markierung GFP-positiver Neurone in allen Aufnahmen durch grüne Pfeile, SOM-positiver Neurone durch weiße Pfeile und GAD65/67-positiver Neurone mit roten Pfeilen. In der Abbildung dargestellte GFP-positive Neurone der EPP stellen sich dabei als SOM- und GAD65/67-negativ dar. Das SOM-positive Neuron ist GAD65/67-positiv. Maßbalken 20  $\mu\text{m}$ .

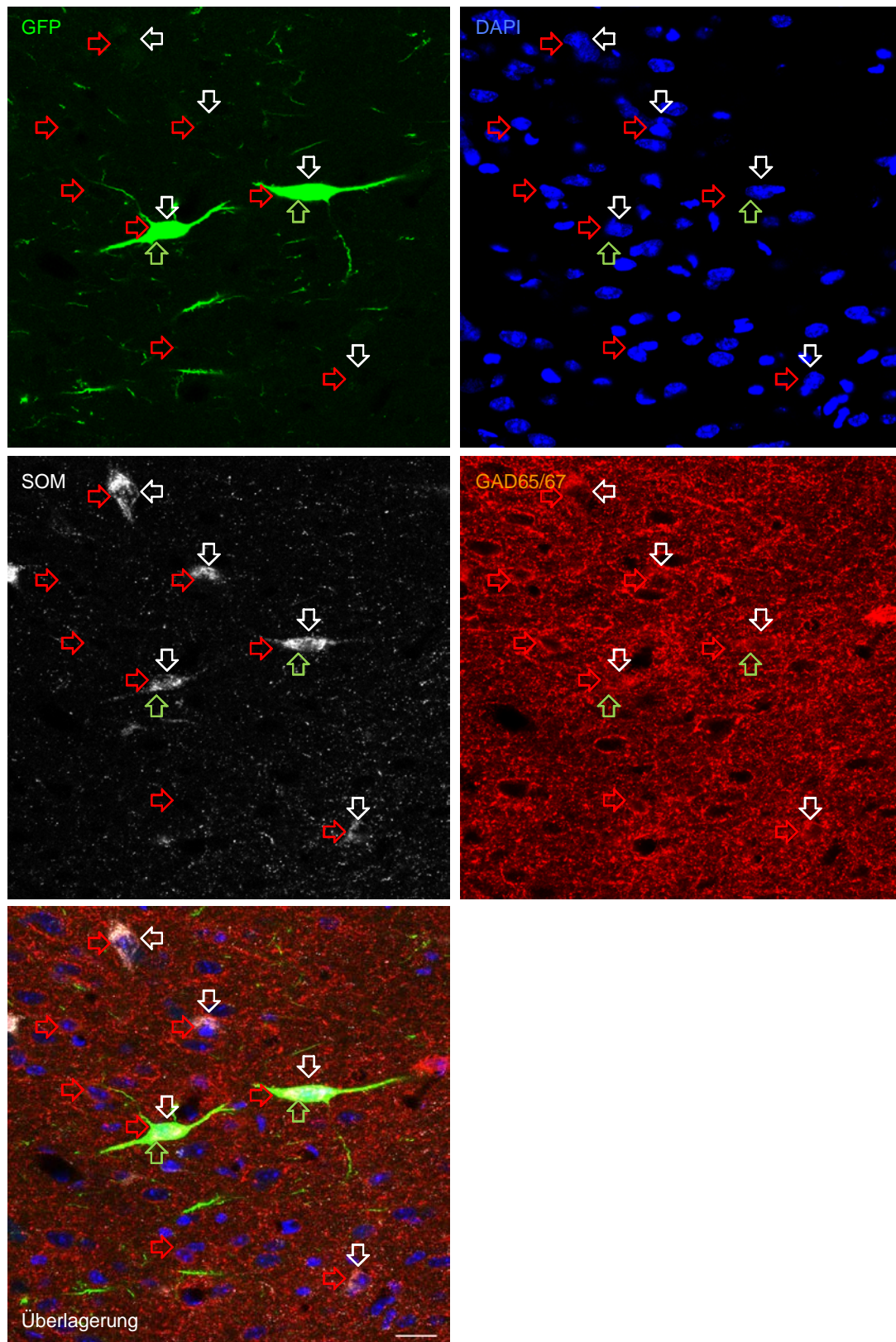


Abbildung 11: Darstellung der Coexpression von GFP, SOM, GAD65/67 und DAPI im piriformen Cortex. Konfokale Aufnahme einer GFP-Färbung (oben links), einer DAPI-Färbung (oben rechts), einer SOM-Färbung (Mitte links), einer GAD65/67-Färbung (Mitte rechts) und der Überlagerung aller Einzelaufnahmen. Markierung GFP-positiver Neurone in allen Aufnahmen durch grüne Pfeile, SOM-positiver Neurone durch weiße Pfeile und GAD65/67-positiver Neurone mit roten Pfeilen. In der Abbildung dargestellte GFP-positive Neurone des piriformen Cortex stellen sich dabei als SOM- und GAD65/67-positiv dar. Maßbalken 20  $\mu\text{m}$ .

EPP	%
(1) Doppelpos. GFP/GAD65/67-Zellen von allen GFP-pos. Zellen	1.5 ± 0.4
(2) Doppelpos. GAD65/67/SOM-positive von allen SOM-pos. Zellen	96.2 ± 1.1

Tabelle 6: Coexpressionsmuster von GAD65/67 in GFP-positiven Neuronen (1) und von GAD65/67 in SOM-positiven Neuronen (2) in Prozent mit SEM

#### 4.2.7. Expression der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\alpha$ in der endopiriformen Population

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde der grundsätzlich angenommene GABAerge Charakter der GFP-positiven Neurone der EPP in Frage gestellt. Es folgten Immunfärbungen mit CaMKII $\alpha$ , einem spezifischen Marker für Pyramidenzellen.

Die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym und spielt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel, bei der Regulation der Ionenpermeabilität sowie bei der Synthese und Freisetzung von Transmittern in neuronalen Geweben [Bennett et al., 1983]. Von dieser Kinase sind vier Isoformen bekannt:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  [Bennett et al., 1983, Tobimatsu et al., 1989], die in neuronalem Gewebe ausschließlich von Neuronen exprimiert werden. Die  $\gamma$ - und  $\delta$ -Unterformen sind auch in anderen Geweben beschrieben worden [Tobimatsu et al., 1989]. Die Verteilung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen im Gehirn unterscheidet sich ebenfalls. Die CaMKII $\alpha$  wird vor allem im Vorderhirn exprimiert, die  $\beta$ -Form dagegen hauptsächlich in Cerebellum und Hirnstamm. Insgesamt ist die  $\alpha$ -Isoform am häufigsten vertreten und bildet etwa 1% des Gesamtproteins im Vorderhirn [Eröndu et al., 1985]. Die gleichzeitige Expression von CaMKII $\alpha$  und GAD67 schließt sich scheinbar aus; sie konnten bisher noch nicht in der gleichen Zelle nachgewiesen werden [Benson et al., 1991, Zou et al., 2002]. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass GABAerge Interneurone, anders als Pyramidenzellen, kein CaMKII $\alpha$  exprimieren. Dies wurde für Neurone der Amygdala bestätigt [McDonald et al., 2002]. Da die palliale Amygdala möglicherweise mit dem endopiriformen Nucleus und auch dem Claustrum verwandt ist [Medina et al., 2004], wurde CaMKII $\alpha$  auch in dieser Arbeit als Marker verwendet, um GFP-positive Neurone der EPP zu untersuchen.



Es wurden Dreifachfärbungen mit GAD65/67, GFP und CaMKII $\alpha$  angefertigt (mind. 10 Gewebeschnitte bei 4 Mäusen). Dabei zeigte sich, dass  $91,4\% \pm 1,1$  SEM der GFP-positiven Zellen in der EPP CaMKII $\alpha$  coexprimierten (Tab. 7). Gleichzeitig wurde so gut wie keine Coexpression von GAD65/67 und CaMKII $\alpha$  gefunden ( $0,5\% \pm 0$  SEM), so dass auch in der EPP davon auszugehen war, dass beide Marker unterschiedliche Neuronenpopulationen voneinander abgrenzen (Tab. 7). GFP-positive Zellen, die CaMKII $\alpha$  coexprimierten, bildeten einen Anteil von  $22,1\% \pm 1,4$  SEM aller CaMKII $\alpha$ -positiven Neurone (siehe Tab. 7). Bei Vergleich der Zahl aller CaMKII $\alpha$ -positiver Zellen zu allen GAD65/67-positiven Zellen ergab sich etwa ein Verhältnis von 9:1 (4105 CaMKII $\alpha$ -positive Zellen zu 430 GAD65/67-positiven Neuronen).

Unter solchen Neuronen, die CaMKII $\alpha$  exprimierten, variierte die Intensität des GFP-Gehalts deutlich, dennoch waren diese Zellen größtenteils eindeutig als positiv zu identifizieren.

Die Coexpression von CaMKII $\alpha$  mit GFP und GAD65/67 in der EPP wurde in Abbildung 12 dargestellt. In Abbildung 13 konnte die Coexpression von CaMKII $\alpha$  mit GFP und GAD65/67 im piriformen Cortex gezeigt werden. Es fiel auf, dass GFP-positive Neurone der EPP im Gegensatz zu den GIN des piriformen Cortex kein GAD65/67 exprimierten, dafür aber CaMKII $\alpha$  positiv waren.

Gleichzeitig zeigte sich, dass GAD65/67 und CaMKII $\alpha$  zwei nicht überlappende Neuronenpopulationen markierten. Solche Neurone, die GAD65/67 exprimierten, waren CaMKII $\alpha$  negativ, während diejenigen, die CaMKII $\alpha$  exprimierten, negativ für GAD65/67 waren.

<b>EPP</b>	<b>%</b>
(1) Doppelpos. GFP/CaMKII $\alpha$ -Zellen von allen GFP-pos. Zellen	$91.4 \pm 1.1$
(2) Doppelpos. GFP/CaMKII $\alpha$ -Zellen von allen CaMKII $\alpha$ -pos. Zellen	$22.1 \pm 1.4$
(3) Doppelpos. GAD65/67/CaMKII $\alpha$ -Zellen von allen CaMKII $\alpha$ -pos. Zellen	$0.5 \pm 0$

Tabelle 7: Coexpressionsmuster von CaMKII $\alpha$  in GFP-positiven Neuronen (1), von GFP in CaMKII $\alpha$ -positiven Neuronen (2) und von GAD in CaMKII $\alpha$ -positiven Neuronen (3).

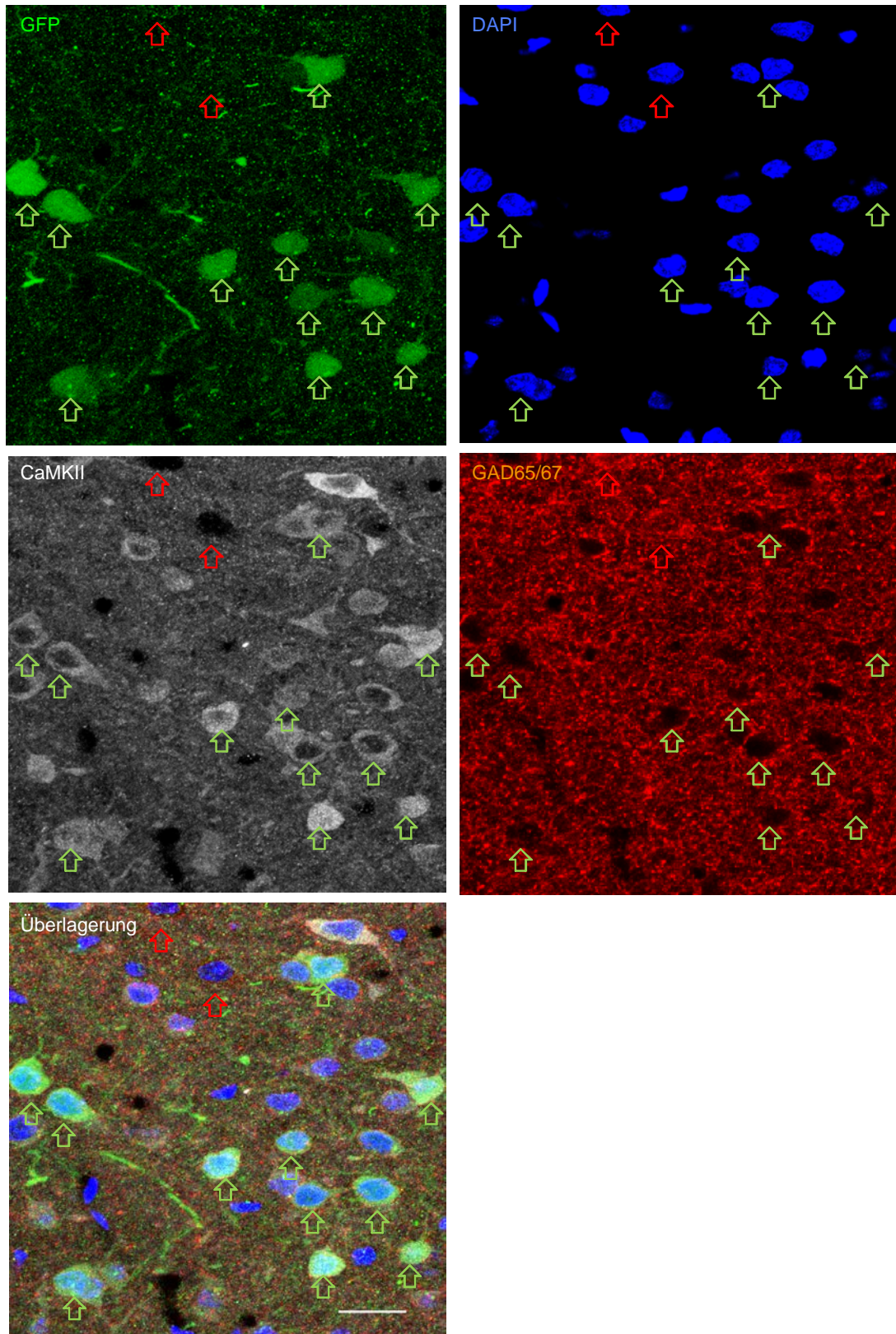


Abbildung 12: Coexpression von GFP, CaMKII $\alpha$ , GAD65/67 und DAPI in der endopiriformen Population (EPP). Konfokale Aufnahme einer GFP-Färbung (oben links), einer DAPI-Färbung (oben rechts), einer CaMKII $\alpha$ -Färbung (Mitte links), einer GAD65/67-Färbung (Mitte rechts) und der Überlagerung aller Einzelaufnahmen. Markierung GFP-positiver Neurone in allen Aufnahmen durch grüne Pfeile und GAD65/67-positiver Neurone mit roten Pfeilen. In der Abbildung dargestellte GFP-positive Neurone in der EPP stellen sich dabei als CaMKII $\alpha$ -positiv dar. Deutlich zu sehen ist auch die Darstellung GAD65/67-positiver Neurone als CaMKII $\alpha$ -negativ. Maßbalken 20  $\mu$ m.

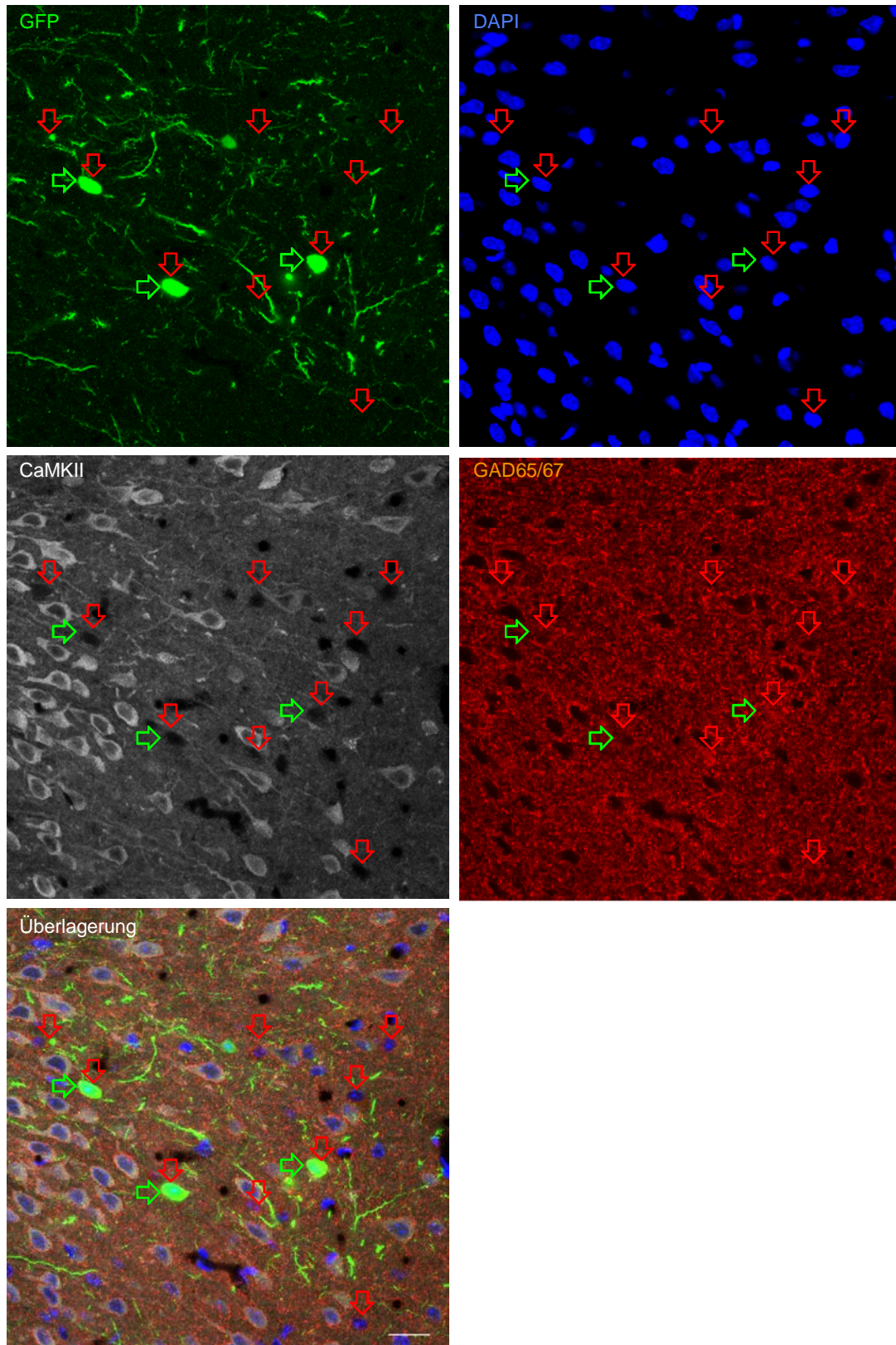


Abbildung 13: Coexpression von GFP, CaMKII $\alpha$ , GAD65/67 und DAPI im piriformen Cortex. Konfokale Aufnahme einer GFP-Färbung (oben links), einer DAPI-Färbung (oben rechts), einer CaMKII $\alpha$ -Färbung (Mitte links), einer GAD65/67-Färbung (Mitte rechts) und der Überlagerung aller Einzelaufnahmen. Markierung GFP-positiver Neurone in allen Aufnahmen durch grüne Pfeile und GAD65/67-positiver Neurone mit roten Pfeilen. In der Abbildung dargestellte GFP-positive Neurone (GIN) stellen sich als CaMKII $\alpha$ -negativ und GAD65/67-positiv dar. Deutlich zu sehen ist auch die Darstellung GAD65/67-positiver Neurone als CaMKII $\alpha$ -negativ. Maßbalken 20  $\mu$ m.

### 4.3. Zusammenfassung des neurochemischen Profils

Folgende Punkte waren festzuhalten:

- 1) GFP-positive Zellen der EPP waren zu 97-99% negativ für Somatostatin.
- 2) Keine der untersuchten GFP-positiven Zellen zeigte eine Coexpression mit dem Calcium-bindenden Protein Parvalbumin.
- 3) 1-3% aller GFP-positiven Zellen stellten sich als „echte“ GIN dar, kennzeichneten sich also durch positive Immunreaktivität für GAD65/67 und Somatostatin.
- 4) 97-99% der Zellen waren negativ für GAD65/67
- 5) Über 90% exprimierten die Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II $\alpha$
- 6) GABAerge und CaMKII $\alpha$ -exprimierende Zellen bildeten zwei unterschiedliche Zellpopulationen, die sich in einem Verhältnis von 1:9 zueinander verteilten.

Daraus ließ sich schließen, dass es sich bei der GFP-exprimierenden Population in der EPP um mindestens zwei unterschiedliche Neuronenarten handelte, nämlich GABAerge Interneurone (1-3%) und Nicht-GABAerge Neurone (97-99%). Ein Großteil der Nicht-GABAergen Zellen von 90% war positiv für CaMKII $\alpha$  und damit möglicherweise glutamaterg. Ein kleiner Teil von 5-7% zeigte weder Immunreaktivität für GAD65/67 noch für CaMKII $\alpha$ .

#### **4.4. Morphometrische Analyse der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population**

Die Morphologie der GFP-positiven Zellen in der EPP wurde durch Biocytin-Injektionen untersucht, die während der später beschriebenen elektrophysiologischen Ableitungen erfolgten.

Aufnahmen von 19 GFP-positiven Neuronen und von 11 GFP-negativen Neuronen (Population), von 8 GIN und von 7 Pyramidenzellen (Neokortex) wurden erstellt. Davon wurden 10 GFP-positive Neurone, 4 GFP-negative Neurone, 5 Pyramidenzellen und 5 GIN digital rekonstruiert. Es wurden solche Zellen ausgesucht, die sich in den Bildaufnahmen als so gut wie vollständig darstellten. Für die Rekonstruktion wurden mehrere Aufnahmen einer Zelle (Z-Stapel) bei fixierter X- und Y-Achse angefertigt, um die ganze Zelle mit Fortsätzen darstellen zu können. Die einzelnen Aufnahmen wurden zu einem Gesamtbild zusammengesetzt, so dass alle Zellfortsätze in einer Ebene dargestellt werden konnten. Anhand dieser Aufnahmen wurden Dendriten, Axon und Soma manuell nachverfolgt. Aus den entstandenen zweidimensionalen Rekonstruktionen der einzelnen Zellen wurden folgende morphometrische Daten gesammelt: Durchmesser des Somas, primäre dendritische Fortsätze, Gesamtlänge, Gesamtfläche, Verzweigungspunkte und höchster Verzweigungsgrad der dendritischen Fortsätze und für GIN und GFP-positive Neurone zusätzlich die Axonlänge.

In Sholl-Analysen [Sholl, 1953] wurden die Zahl der dendritischen und axonalen Verzweigungspunkte pro Sphäre und die Länge der jeweiligen Fortsätze innerhalb eines Sektors bestimmt.

##### **4.4.1. Die Morphologie der einzelnen Zellgruppen**

Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten, dass es sich bei den GFP-positiven Neuronen der EPP nicht um GABAerge Interneurone vom GIN-Typ handelte [Oliva et al., 2000, Riedemann et al., 2016]. Stattdessen zeigten sie sich für den Pyramidenzellmarker CaMKII $\alpha$ -positiv. Hier erfolgte die morphometrische Analyse dieser Zellen.



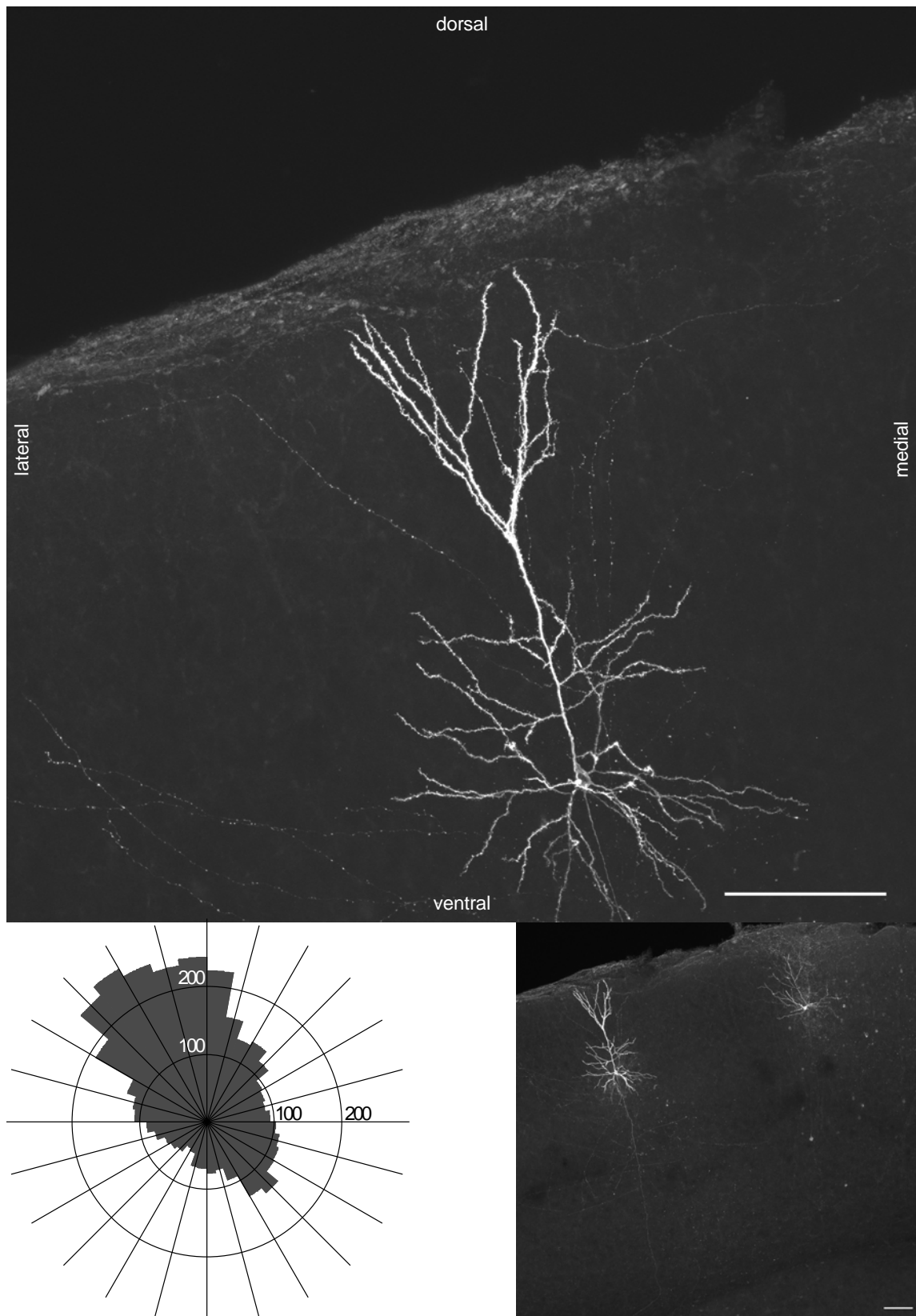


Abbildung 14: Darstellung einer Pyramidenzelle in Nah- und Übersichtsaufnahme und deren Polaritätshistogramm (unten links). Konfokalaufnahme des sensomotorischen Kortex (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ) sowie der dazugehörigen Übersichtsaufnahme unten rechts (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ); nach ventral: weiße Substanz; nach dorsal: Piaoberfläche.

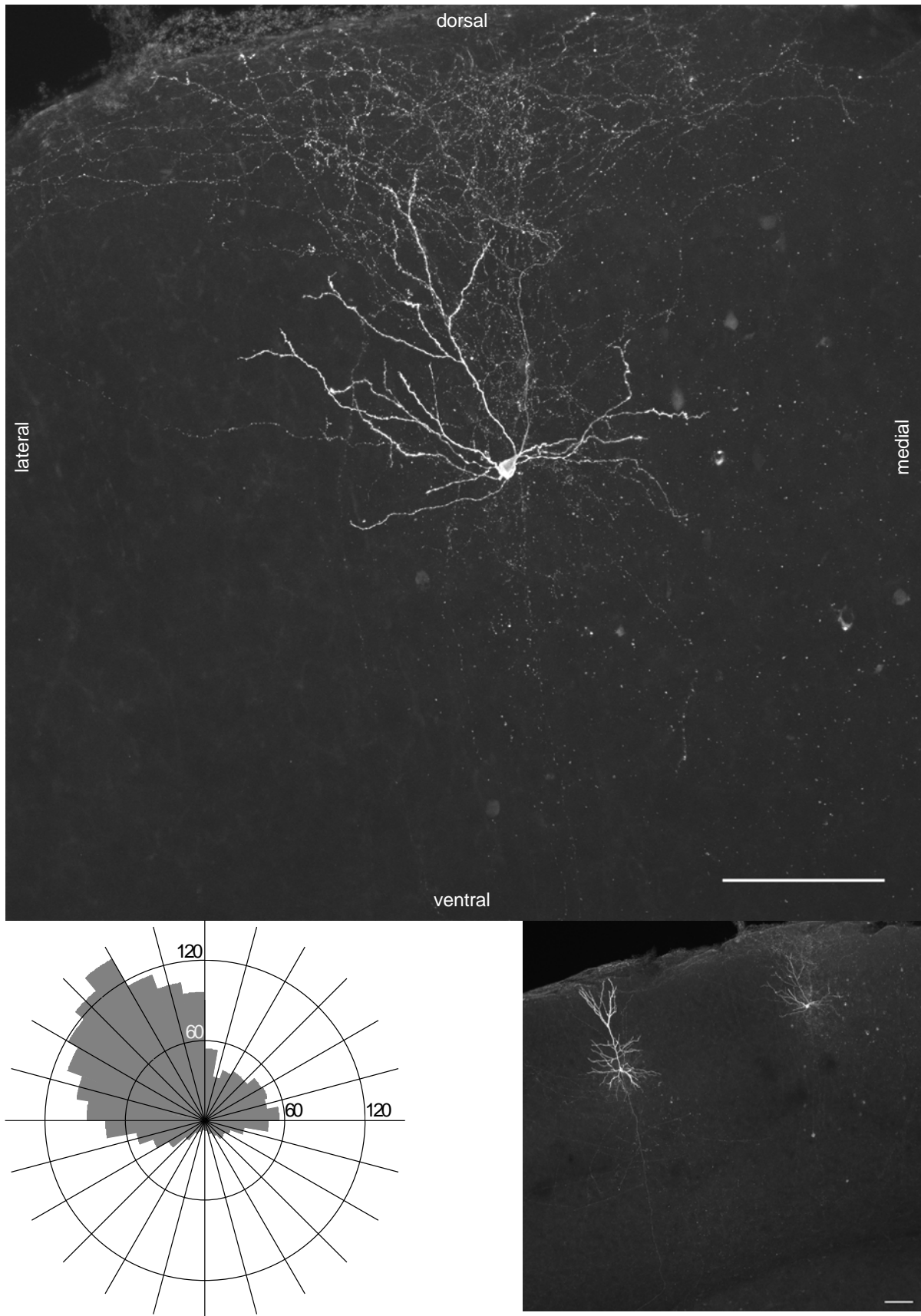


Abbildung 15: Darstellung eines GIN in Nah- und Übersichtsaufnahme sowie dessen Polaritätshistogramm (unten links). Konfokalaufnahme des sensomotorischen Kortex (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ) sowie der dazugehörigen Übersichtsaufnahme unten rechts (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ; nach ventral: weiße Substanz; nach dorsal: Piaoberfläche).

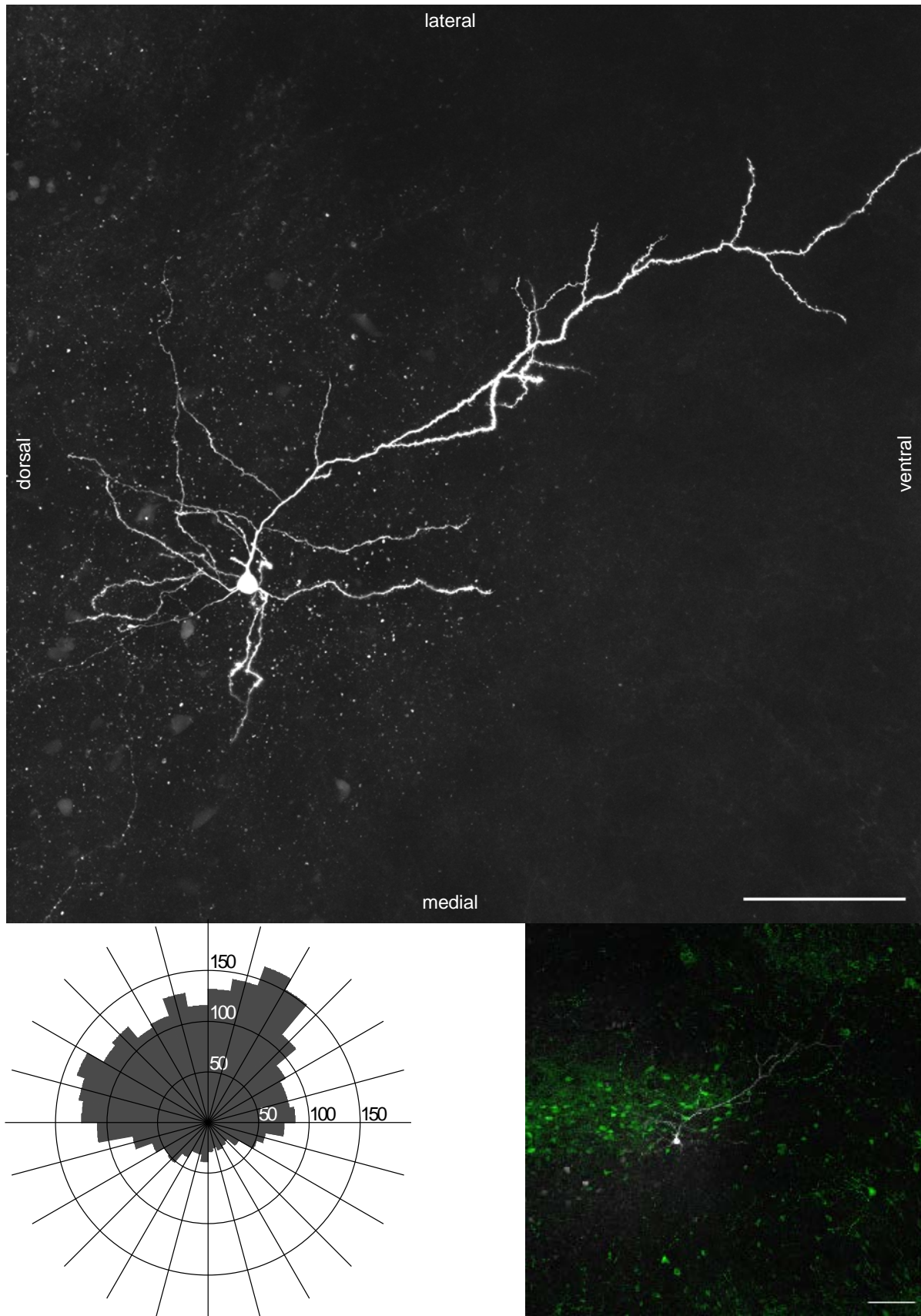


Abbildung 16: Darstellung eines GFP-positiven Neurons der endopiriformen Population in Nah- und Übersichtsaufnahme und dessen Polaritätshistogramm (unten links). Konfokalaufnahme eines Biocytin-gefärbten GFP-positiven Neurons (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ) sowie die dazugehörige Übersichtsaufnahme unten rechts (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ). nach medial: weiße Substanz; nach lateral: Piaoberfläche.



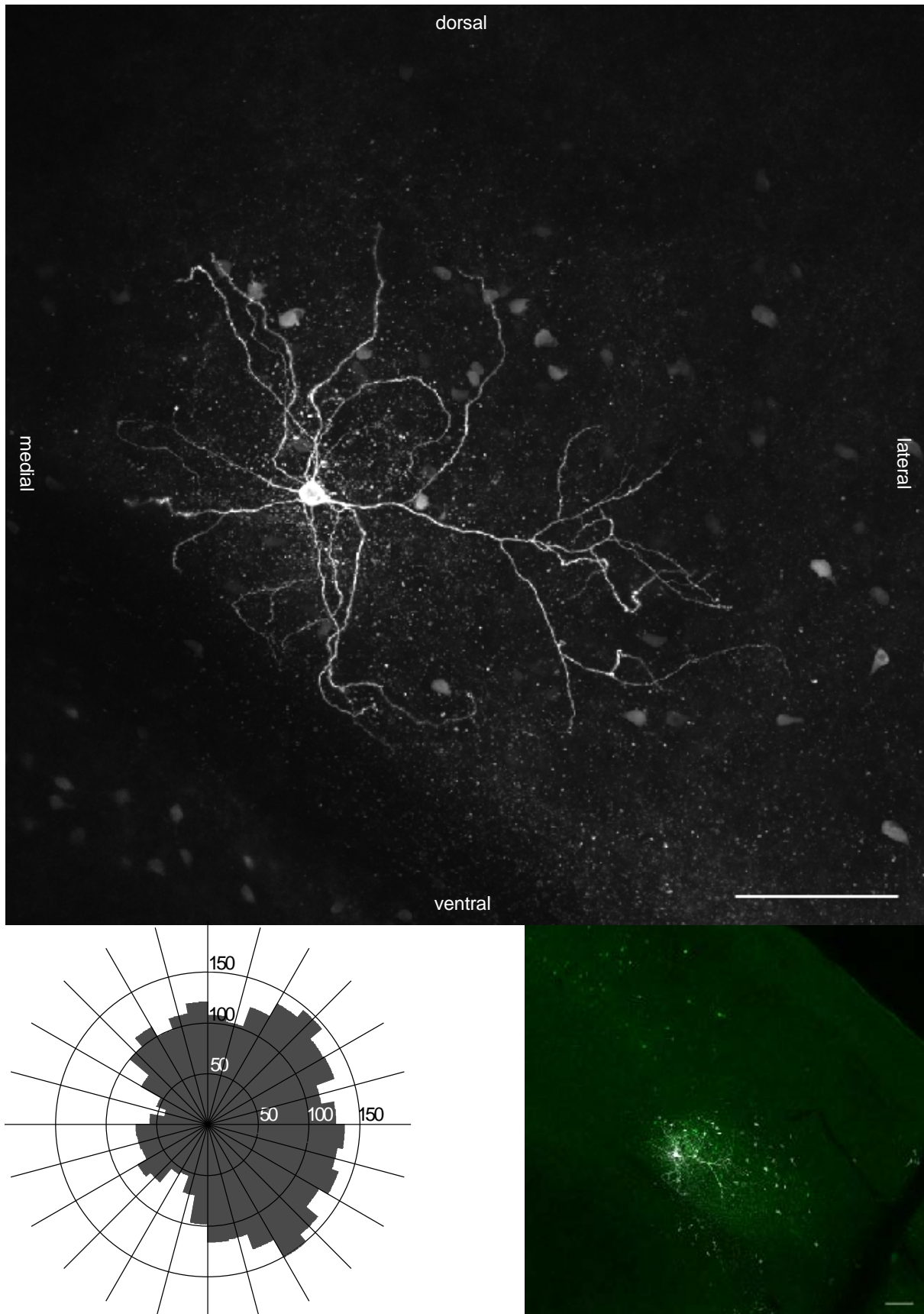


Abbildung 17: Darstellung eines GFP-negativen Neurons der endopiriformen Population in Nah- und Übersichtsaufnahme und dessen Polaritätshistogramm (unten links). Konfokalaufnahme eines Biocytin-gefärbten GFP-negativen Neurons (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ) und die dazugehörige Übersichtsaufnahme unten rechts (Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ ). nach medial: weiße Substanz; nach lateral: Piaoberfläche.

Pyramidenzellen zeichnen sich wie in der Einleitung beschrieben im Gegensatz zu Interneuronen durch einen ausgeprägten apikalen Dendriten aus, der den Zellkern gewöhnlich in Richtung Piaoberfläche verlässt sowie durch mehrere kleinere basale Dendriten, die horizontal zur Cortexoberfläche verlaufen. Die dendritischen Fortsätze sind mit zahlreichen Dornfortsätzen besetzt. Das Axon projiziert nach distal und gibt dabei Kollateralen in unterschiedliche Regionen ab. Dieser Phänotyp konnte bei den rekonstruierten Pyramidenzellen bestätigt werden (siehe Abb. 1 und Abb. 14). Axonale Fortsätze dieser Pyramidenzellen waren größtenteils schwer darzustellen, da sie häufig zumindest teilweise außerhalb der Schnittebene verliefen. In zwei Zellen konnte das Axon über weite Strecken verfolgt werden, dieser Verlauf wurde aber aufgrund der geringen Aussagekraft ( $n=2$ ) nicht in der weiteren Auswertung berücksichtigt.

Für die Rekonstruktion von GIN wurden 5 Zellen aus corticalen Schichten ausgewählt. Hierbei zeigte sich, dass diese eine multipolare bis bipolare somatodendritische Morphologie aufwiesen und ein Axon besaßen, das sich in der Ursprungsschicht stark verzweigte und sich oftmals in Richtung der Schicht I ausbreitete. Dornfortsätze waren nicht oder nur spärlich vorhanden. Abbildung 15 zeigt ein solches GIN, das zur Gruppe der Martinotti-Zellen zählte (vgl. auch Abb.3, die ein GIN aus der CA3-Schicht des Hippocampus zeigt).

Von 19 untersuchten GFP-positiven Neuronen der EPP zeigten 16 eine pyramidale Morphologie, eine Zelle ähnelte mehr einem Interneuron, bei zwei weiteren gelang das Anfärben nicht ausreichend. Bei der für die Rekonstruktion ausgewählten Zellen zeigte sich ein pyramidaler Charakter der GFP-positiven Neurone ( $n = 10$ ): größtenteils wiesen sie einen Hauptdendriten auf, der jedoch nicht wie bei Pyramidenzellen in Richtung der Piaoberfläche verlief, sondern das Soma nach ventrolateral, ventral oder ventromedial verließ (siehe Abb. 16). Mehrere kleinere basale Dendriten verliefen nahe dem Zellkörper. Die dendritischen Fortsätze zeichneten sich ebenfalls wie Pyramidenzellen durch zahlreiche Dornfortsätze aus. Das Axon verzweigte regional weit weniger extensiv als bei den GIN und verließ im Verlauf oft die Schnittebene. Die Morphologie der GFP-positiven Neurone der EPP unterschied sich damit deutlich von der Morphologie der GIN (vgl. Abb. 1, 3, 15 und 16).

Die Rekonstruktion der GFP-negativen Neurone der EPP ergab, dass 8 von 10 Zellen einen Hauptdendriten aufwiesen, der den Zellkern nach ventrolateral oder ventral verließ (Abb. 17). 2 von 10 Zellen ähnelten morphologisch mehr einem Interneuron.

Die Rekonstruktion des axonalen Verlaufs war in diesem Zelltyp schwierig und wurde nicht in der weiteren Auswertung berücksichtigt.

#### **4.4.2. Zellgröße und Zellfortsätze der rekonstruierten Neuronen**

Zu Beginn der Analyse wurden verschiedene morphometrische Daten aus den vier Zellgruppen bestimmt (siehe Tab. 8),

Bezüglich des Durchmessers des Somas zeigte sich, dass das Soma GFP-positiver Neurone und GFP-negativer Neurone im Vergleich zu GIN und Pyramidenzellen kleiner war. Die ermittelten Werte waren zwischen den einzelnen Gruppen jedoch nicht signifikant verschieden (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis Multiplen Post-Tests). Ebenfalls nicht signifikant verschieden war die Anzahl der dendritischen Primärprozesse, die in allen Gruppen eine ähnliche Größenordnung erreichte (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis Multiplen Post-Tests).

Signifikant verschieden war die Gesamtlänge aller dendritischen Fortsätze der Pyramidenzellen im Vergleich zu den anderen Zellgruppen (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis Multiplen Post-Test). Gleiches galt für die Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte: Pyramidenzellen erreichten die höchsten Werte und unterschieden sich in diesem Punkt signifikant von allen anderen Zellgruppen (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis Multiplen Post-Tests). Bezüglich der Gesamtfläche der dendritischen Fortsätze unterschieden sich Pyramidenzellen signifikant von den GIN, genauso unterschieden sich GFP-positive Neurone signifikant von den GIN (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis Multiplen Post-Tests). Den höchsten Verzweigungsgrad des Dendritenbaums erreichten Pyramidenzellen. Damit unterschieden sie sich signifikant von GIN, genauso wie GFP-positive Neurone sich im Hinblick auf den Verzweigungsgrad signifikant von GIN unterschieden (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

Bezüglich der axonalen Länge wurden GFP-positiven Neurone mit GIN verglichen. Die Gesamtlänge der Axone der GIN war signifikant größer als die der GFP-positiven Neurone (unverbundener t-test).

	<b>GFP-pos.</b>	<b>GFP-neg.</b>	<b>GIN</b>	<b>PY</b>
Durchmesser des Somas [µm]	40.2 ± 2.5	41.9 ± 6.3	46 ± 6.7	47.6 ± 6.2
Keine signifikanten Unterschiede				
Anzahl dendritischer Primärprozesse	4.4 ± 1	5.3 ± 0.5	5.4 ± 1.3	5.8 ± 1.3
Keine signifikanten Unterschiede				
Gesamtlänge aller Dendriten [µm]	2926 ± 381	2642 ± 975	1711 ± 490	4266 ± 1330
PY zu GIN***, GFP-pos zu PY*, GFP-neg zu PY*				
Gesamtfläche aller Dendriten [µm <sup>2</sup> ]	6189 ± 716	5241 ± 2324	2472 ± 675	7595 ± 3241
GIN zu PY**, GFP-pos zu GIN**				
Gesamtzahl der dendriti- schen Verzweigungspunkte	22.6 ± 4.2	17 ± 8.5	16.8 ± 3.6	37.8 ± 7.9
PY zu GIN***, GFP-pos zu PY***, GFP-neg zu PY***				
Maximaler Verzweigungs- grad des Dendritenbaums	10.4 ± 2.3	7.3 ± 1.5	6.2 ± 1.3	13.6 ± 5
GIN zu PY**, GFP-pos zu GIN*				
Gesamtlänge aller Axone [µm]	2153 ± 965		6597 ± 2594	
GFP-pos zu GIN**				

Tabelle 8: Darstellung der ermittelten morphometrischen Werte mit SD in den vier Zellgruppen (GFP-positive Neurone = GFP-pos., GFP-negative Neurone = GFP-neg., Pyramidenzellen = PY und GIN). Die jeweiligen Signifikanzen sind unterhalb der ermittelten Werte angegeben.

#### 4.4.3. Sholl-Analyse der dendritischen Fortsätze

In der Sholl-Analyse wurden konzentrische Kreise mit zunehmendem Abstand um das Soma einer Zelle gezogen [Sholl, 1953]. Dabei wurde die Länge der dendritischen und axonalen Fortsätze und die Zahl dendritischer und axonaler Verzwei-

gungspunkte innerhalb einer Sphäre bestimmt. In dieser Analyse betrug der Radius der innersten Sphäre 10  $\mu\text{m}$  zum Mittelpunkt (das Soma) und wurde mit jeder folgenden Sphäre um 20  $\mu\text{m}$  vergrößert.

Zuerst wurde die Länge der dendritischen Fortsätze innerhalb einer Sphäre ermittelt und graphisch gegenüber der Distanz zum Soma aufgetragen. Neben der Länge der dendritischen Fortsätze innerhalb einer Sphäre konnte damit auch die Gesamtlänge aller Fortsätze pro Zelle bestimmt werden.

So geht aus Abb. 18 A hervor, dass bei Pyramidenzellen in einer Entfernung von 50-70  $\mu\text{m}$  zum Soma die Länge der Fortsätze ein Maximum erreichten, ebenso bei GFP-positiven Neuronen. Bei GIN lag dieses Maximum zwischen 90-110  $\mu\text{m}$  und bei GFP-negativen Neuronen zwischen 70-90  $\mu\text{m}$ . Einen zusätzlichen Gipfel bei 430-530  $\mu\text{m}$  zeigten nur Pyramidenzellen. Dort nahm die dendritische Länge pro Sphäre noch einmal zu. In allen anderen Gruppen nahm die dendritische Länge nach dem ersten Maximum kontinuierlich ab und erreichte nicht die maximale Entfernung der dendritischen Fortsätze der Pyramidenzellen (vgl. Gesamtlänge aller Dendriten, Tab. 8). Die dendritischen Fortsätze der GIN waren regional beschränkt und erreichten nur einen Maximalradius von 230  $\mu\text{m}$ . Signifikante Unterschiede fehlten jedoch.

Abbildung 18 B stellt die dendritischen Verzweigungspunkte der verschiedenen Zellgruppen innerhalb einer Sphäre dar und zeigte ein komplementäres Bild zu Abbildung 18 A.

#### **4.4.4. Sholl-Analyse der axonalen Fortsätze**

Neben den dendritischen Fortsätzen wurden auch axonale Fortsätze in einer Sholl-Analyse hinsichtlich ihrer Gesamtlänge und der Länge innerhalb einer Sholl-Sphäre untersucht. Da die gesammelten Daten von Pyramidenzellen und von GFP-negativen Neuronen zu gering waren, wurden GFP-positive Neurone und GIN verglichen.

Die axonale Länge pro Sphäre erreichte in GIN deutlich höhere Werte als in GFP-positiven Neuronen (zwischen 130  $\mu\text{m}$  und 250  $\mu\text{m}$  Sholl-Radius). GFP-positive Neurone hatten eine relativ konstante Längenverteilung über alle Sphären hinweg, erreichten aber mit 550  $\mu\text{m}$  eine etwas größere axonale Gesamtausdehnung als GIN mit 390  $\mu\text{m}$  (siehe Abb. 18 C). Die Gesamtlänge aller axonalen Fortsätze pro Sphäre zeigte bei den GFP-positiven Neuronen ab 130  $\mu\text{m}$  bis 250  $\mu\text{m}$  signifikante Unter-

schiede ( $p$ -Werte: 130  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.05$ ; 150  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.05$ ; 170  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.05$ ; 190  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.05$ ; 210  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.01$ ; 230  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 250  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ) zur axonalen Gesamtlänge pro Sphäre bei den GIN (Two-way ANOVA mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

Die Anzahl aller gemessenen axonalen Knotenpunkte gab ein zu der Längenverteilung der Fortsätze komplementäres Bild. Zwischen 130-250  $\mu\text{m}$  erreichten GIN ein ausgeprägtes Maximum, während GFP-positive Neurone bei 50-70  $\mu\text{m}$  einen kleinen Gipfel erreichten und daraufhin kontinuierlich abnahmen (Abb. 18 D). Auch hier zeigten sich die GFP-positiven Neurone signifikant verschieden zu den GIN (110  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 130  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.01$ ; 150  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 170  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 190  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 210  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 230  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 250  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.001$ ; 270  $\mu\text{m}$ :  $p < 0.05$ ; Two-way ANOVA mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

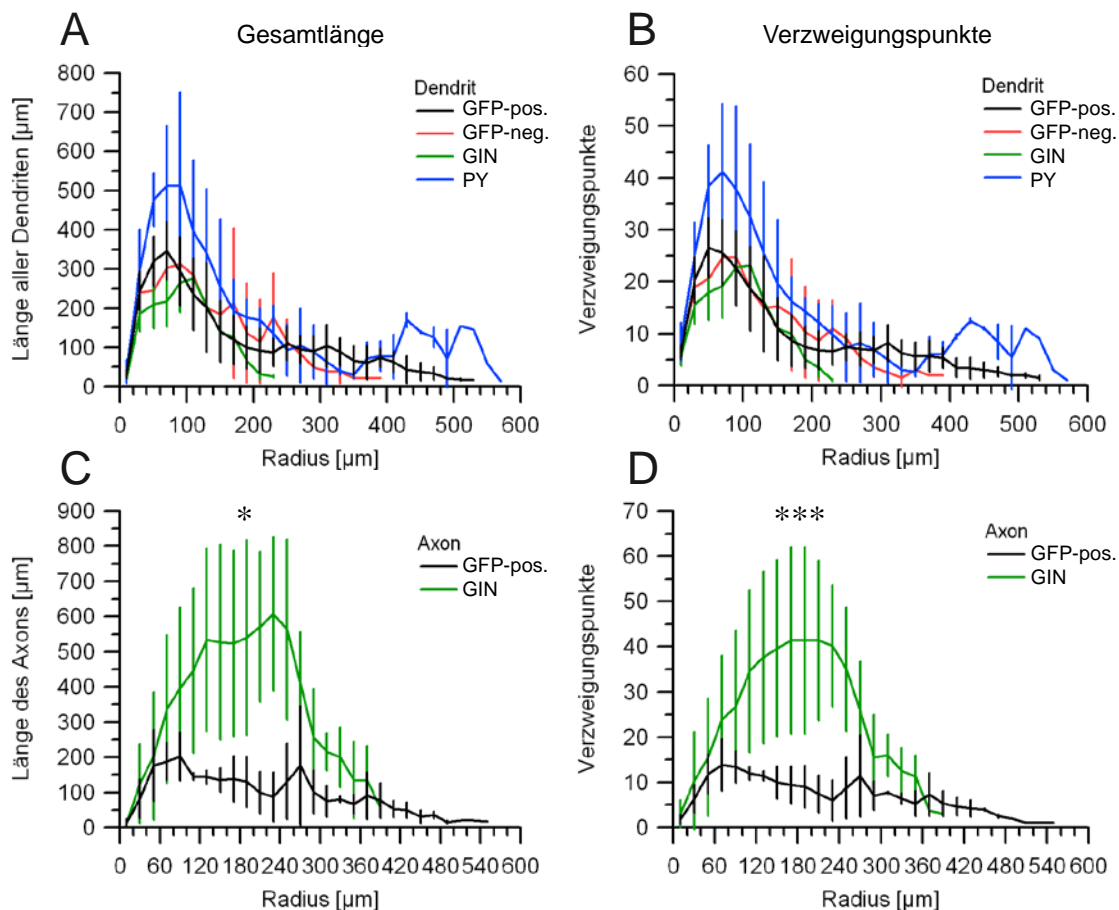


Abbildung 18: Sholl-Analyse der dendritischen und axonalen Fortsätze. Vergleich von GFP-positiven Neuronen (GFP-pos. in schwarz), GFP-negativen Neuronen (GFP-neg. in rot), Pyramidenzellen (PY in blau) und GIN (in grün) als Liniendiagramm. Radiuszunahme jeweils 20  $\mu\text{m}$ , Beginn bei 10  $\mu\text{m}$ .

- A) Darstellung der Gesamtlänge aller Dendriten pro Sholl-Sphäre [ $\mu\text{m}$ ] mit SD.
- B) Darstellung der dendritischen Verzweigungspunkte pro Sholl-Sphäre mit SD.
- C) Darstellung der Gesamtlänge aller Dendriten pro Sholl-Sphäre [ $\mu\text{m}$ ] mit SD.
- D) Darstellung der axonalen Verzweigungspunkte pro Sholl-Sphäre mit SD.

#### **4.5. Zusammenfassung der morphologischen Eigenschaften der GFP-positiven Neurone in der endopiriformen Population**

Insgesamt zeigte die morphologische Untersuchung, dass die GFP-exprimierenden Neurone der EPP nicht nur hinsichtlich ihres neurochemischen Profils, sondern auch bezüglich ihrer Morphologie, eindeutige Unterschiede zu den „echten“ GIN aufwiesen.

Abbildungen der Biocytin-injizierten Zellen wiesen auf die morphologische Ähnlichkeit der GFP-positiven Neurone zu den Pyramidenzellen hin, nicht zu den GIN (siehe Abb. 14,15 und 16 zum Vergleich). Dennoch zeigten GFP-positive Neurone auch im Vergleich zu Pyramidenzellen signifikante Unterschiede bezüglich der Gesamtlänge der Dendriten und der dendritischen Verzweigungspunkte (Tab. 8).

Im Gegensatz zu den „echten“ GIN ergaben sich insbesondere signifikante Unterschiede bezüglich der Axonlänge und des Axonverlaufs sowie hinsichtlich der Gesamtfläche aller Dendriten (Tab. 8).

Interessanterweise konnten zwischen GFP-positiven und GFP-negativen Neuronen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Beide Zellgruppen ähnelten sich in ihrer Morphologie (vgl. Tab.8. und Abb. 16 und 17).

## **4.6. Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population**

Zur Untersuchung der passiven und aktiven elektrophysiologischen Eigenschaften erfolgten Messungen in der Ganzzell-Konfiguration des Patch-Clamp-Verfahrens. Sogenannte Current-Clamp-Messungen wurden an folgenden Zellen durchgeführt: GFP-positive Neurone der EPP, GFP-negative Neurone der EPP, corticale GIN und corticale Pyramidenzellen. Alle Zellen, die in die Analyse eingeschlossen wurden, hatten ein Ruhemembranpotenzial negativer als -55 mV und ein Aktionspotenzial mit deutlichem „*Overshoot*“.

### **4.6.1. Identifikation der Zellen während der elektrophysiologischen Ableitungen**

GFP-positive Neurone der EPP wurden anhand ihrer Lage und ihrer GFP-Fluoreszenz identifiziert. Innerhalb der EPP erfolgte die Auswahl zufällig. Vor den Messungen wurde sowohl ein Fluoreszenz-Bild als auch ein Phasenkontrastbild (Differenzieller Interferenzkontrast, DIC) erstellt (Abb. 19). GFP-negative Zellen wurden im gleichen Verfahren entsprechend durch fehlende Fluoreszenz ausgewählt.

Die Identifikation von GIN aus den oberflächlichen Schichten verschiedener corticaler Gebiete erfolgte durch die starke Eigenfluoreszenz. Pyramidenzellen wurden in DIC-Aufnahmen anhand ihrer pyramidalen Zellform und des apikalen Dendriten nachgewiesen.



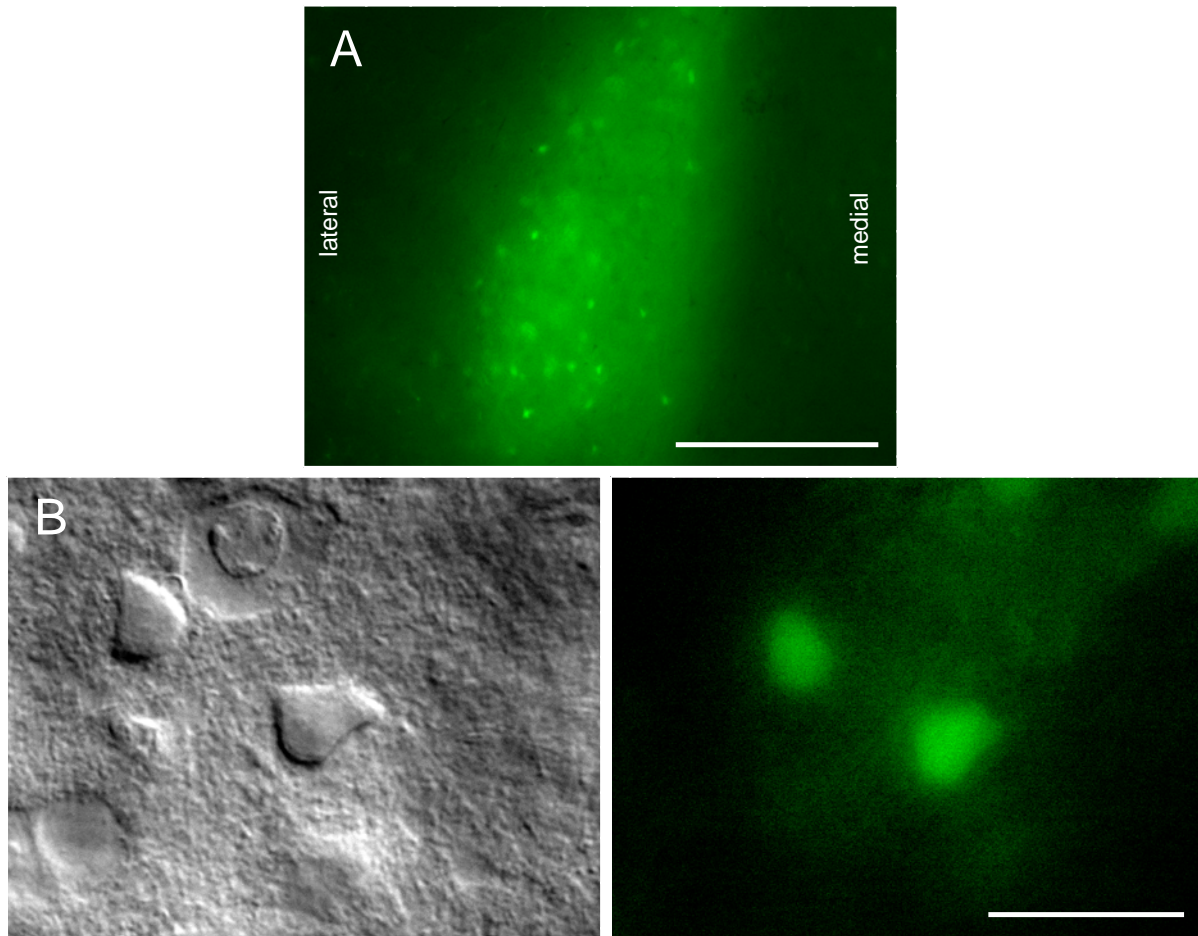


Abbildung 19: Identifikation von Neuronen für elektrophysiologische Untersuchungen. Darstellung GFP-positiver Neurone der lateralen endopiriformen Population (EPP).

A) Übersicht der EPP als Fluoreszenzaufnahme, Maßbalken 250 µm.

B) Nahaufnahme eines untersuchten Neurons als DIC- (links) und Fluoreszenz-Bild (rechts) mit Maßbalken 25 µm.

#### 4.6.2. Passive Eigenschaften GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population

Die passiven Eigenschaften der GFP-positiven Neurone der EPP wurden durch Messung der Spannungsantwort nach Injektion eines hyperpolarisierenden Strompulses (10-20 pA) bestimmt. Zwanzig solcher Spannungsantworten wurden pro Neuron aufgezeichnet und zur Rauschverminderung gemittelt. Aus der gemittelten Spannungsantwort wurden das Ruhemembranpotenzial (RMP), die somatische Membranzeitkonstante  $\tau_0$  und die Zellkapazität  $C_N$  ermittelt. Insgesamt wurden bei 110 Neuronen die passiven Membraneigenschaften bestimmt, davon 45 GFP-positive und 29 GFP-negative Neurone der EPP, 24 GIN und 12 Pyramidenzellen.

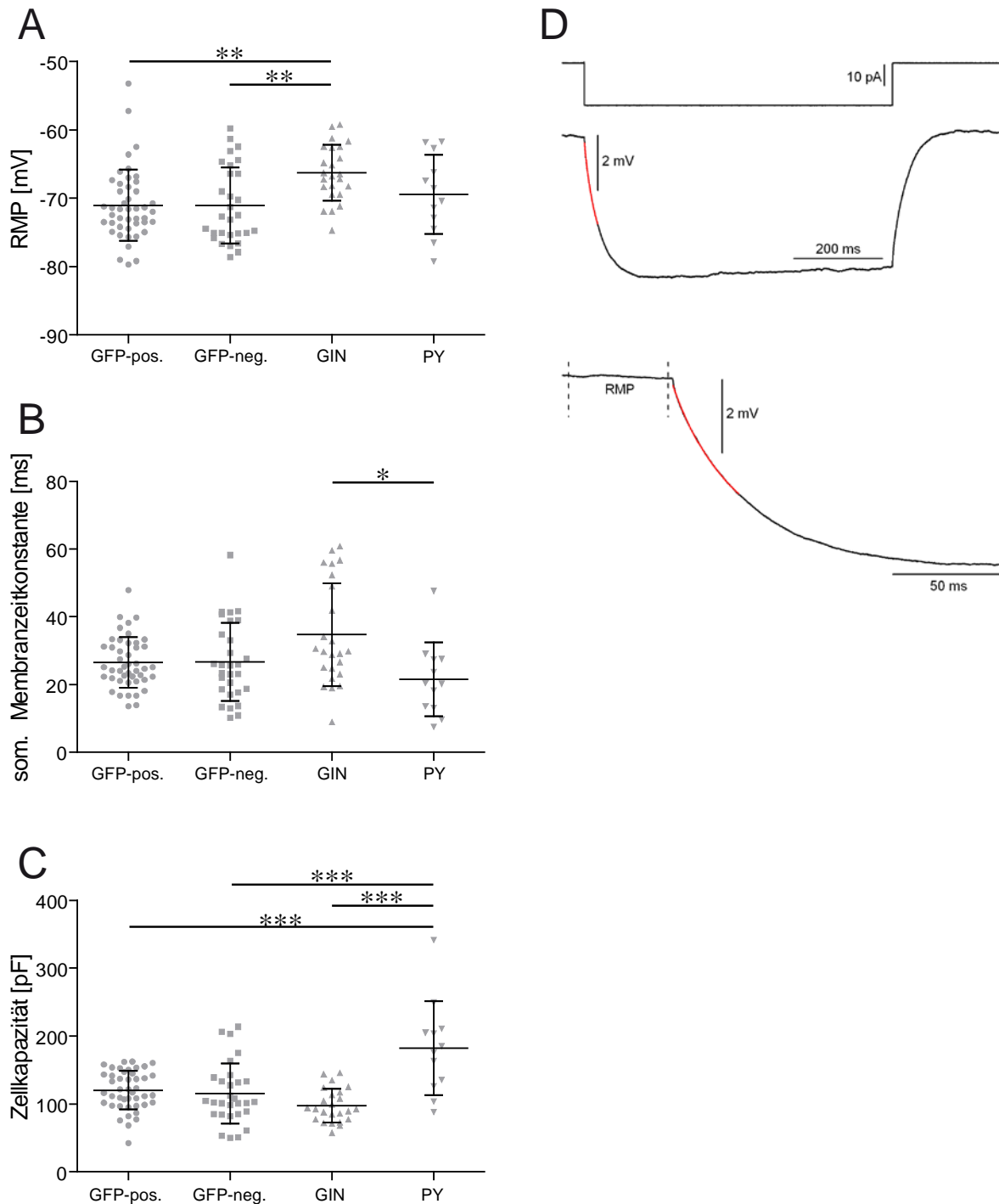


Abbildung 20: Passive Eigenschaften GFP-positiver Neuronen (GFP-pos.) der endopiriformen Population im Vergleich zu GFP-negativen Neuronen (GFP-neg.), GIN und Pyramidenzellen (PY). Darstellung als scatter plot.

A) Darstellung des Ruhemembranpotenzial (RMP) mit SD und Signifikanzen.

B) Darstellung der somatischen Membranzeitkonstante mit SD und Signifikanzen.

C) Darstellung der Zellkapazität mit SD und Signifikanzen.

D) Darstellung der gemittelten Stromkurven (10 pA, Dauer 800 ms) und gemittelten Spannungsantwort des GFP-positiven Neurons. In rot wurde die angepasste Exponentialfunktion zur Bestimmung der Membranzeitkonstanten dargestellt (oben). Unten zu sehen ist eine Teilaufnahme der gemittelten Spannungsantwort mit der angepassten Exponentialfunktion in rot und Darstellung des Zeitraums zur Bestimmung des RMP.

#### 4.6.2.1. Das Ruhemembranpotenzial im Gruppenvergleich

Das RMP wurde in der registrierten Messung vor Injektion des Strompulses bestimmt. GFP-positive Neurone zeigten ein RMP von  $-71 \text{ mV} \pm 5,2 \text{ SD}$ , GFP-negative Neurone eines von  $-71 \text{ mV} \pm 5,6 \text{ SD}$ , das RMP von GIN betrug  $-66,3 \text{ mV} \pm 4,1 \text{ SD}$  und das von Pyramidenzellen  $-69,4 \text{ mV} \pm 5,8 \text{ SD}$  (Abb. 20 A). GFP-positive und GFP-negative Neurone waren jeweils signifikant unterschiedlich zur Gruppe der GIN, aber nicht untereinander (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

#### 4.6.2.2. Vergleich der somatischen Membranzeitkonstante

Die somatische und dendritische Membranzeitkonstante wurde bestimmt, indem aus den ersten 30-70 ms des Spannungsabfalls, der nach Einschalten des Strompulses auftrat, eine Exponentialgleichung mit zwei Termen angepasst wurde (Abb.20 D). Diese Gleichung ist eine Lösung der Rallschen Kabelgleichung in der Zeitdomäne (Rall 1969):

$$V_t = V_0 + V_1 e^{-(t-t_0)/\tau_1} + V_2 e^{-(t-t_0)/\tau_2}$$

Dabei war  $V_0$  das ermittelte Ruhemembranpotenzial,  $V_1$  und  $V_2$  die Amplituden der Nulldurchgänge der Spannungsabweichungen zu den jeweiligen Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$  und  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die Membranzeitkonstanten der beiden Terme. Während  $\tau_1$  als somatische Membranzeitkonstante bezeichnet wird, nennt sich  $\tau_2$  die dendritische Membranzeitkonstante.

Für diese Auswertung wurde nur die somatische Membranzeitkonstante bestimmt. GIN besaßen die längste Membranzeitkonstante mit  $34,8 \text{ ms} \pm 15,2 \text{ SD}$ . Die Membranzeitkonstante der Pyramidenzellen betrug  $21,6 \text{ ms} \pm 10,9 \text{ SD}$ , die der GFP-positiven Neurone  $26,5 \text{ ms} \pm 7,5 \text{ SD}$  und die der GFP-negativen Zellen  $26,7 \text{ ms} \pm 11,5 \text{ SD}$  (Abb. 20 B). Die Membranzeitkonstanten der GIN waren signifikant verschieden zur Gruppe der Pyramidenzellen (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

#### 4.6.2.3. Analyse der Zellkapazität in den vier untersuchten Zellgruppen

Die Zellkapazität  $C_N$  ist ein Maß für die Zelloberfläche. Zwischen  $C_N$  und der Membrankapazität  $C_m$  besteht für verzweigte Neurone ein sehr komplexer Zusammenhang. Die Zellkapazität wurde mittels der Gleichung  $\tau_1 = R_N C_N$  errechnet,  $R_N$  ist der Eingangswiderstand, der aus der Strom-Spannungs-Kurve ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.6.3.1).

Die Gruppe der Pyramidenzellen wies mit  $182,5 \text{ pF} \pm 69,0 \text{ SD}$  die größte Zellkapazität auf. In absteigender Reihenfolge folgten darauf GFP-positive Neurone mit  $120,5 \text{ pF} \pm 28,7 \text{ SD}$ , GFP-negative Neurone mit  $115,3 \text{ pF} \pm 44,4 \text{ SD}$  und zuletzt die GIN mit  $97,5 \text{ pF} \pm 24,6 \text{ SD}$  (Abb. 20 C). Alle drei Gruppen zeigten sich signifikant verschieden zu Pyramidenzellen (ANOVA für multiple Tests mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

#### 4.6.3. Strom-Spannungs-Beziehung GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population

Im Anschluss an die Bestimmung der passiven Membraneigenschaften wurde die Strom-Spannungs-Beziehung der Neurone untersucht. Dazu wurden 20 Rechteckstimpulse (Dauer: 1000 ms) nacheinander in hyper- und depolarisierender Richtung in das Neuron injiziert, wobei die Stromamplitude um jeweils 10% des maximalen negativen Stromwertes verändert wurde. Je nach Eingangswiderstand wurden zwischen -50 bis -300 pA injiziert, um eine Hyperpolarisation des Membranpotenzials von mindestens -100 mV zu erreichen. Die hervorgerufenen, unterschwelligen Spannungsänderungen wurden registriert und an folgenden zwei Zeitpunkten ausgewertet (Abb. 21.1 A):

- 1) Nach Erreichen eines Gleichgewichts (steady state, ca. 800 ms nach Beginn der Strominjektion).
- 2) Die Spannungsantwort kurz nach Beginn der Strominjektion (initiale Phase, ca. 50-200 ms nach Strominjektion).

## GFP-positive Neurone

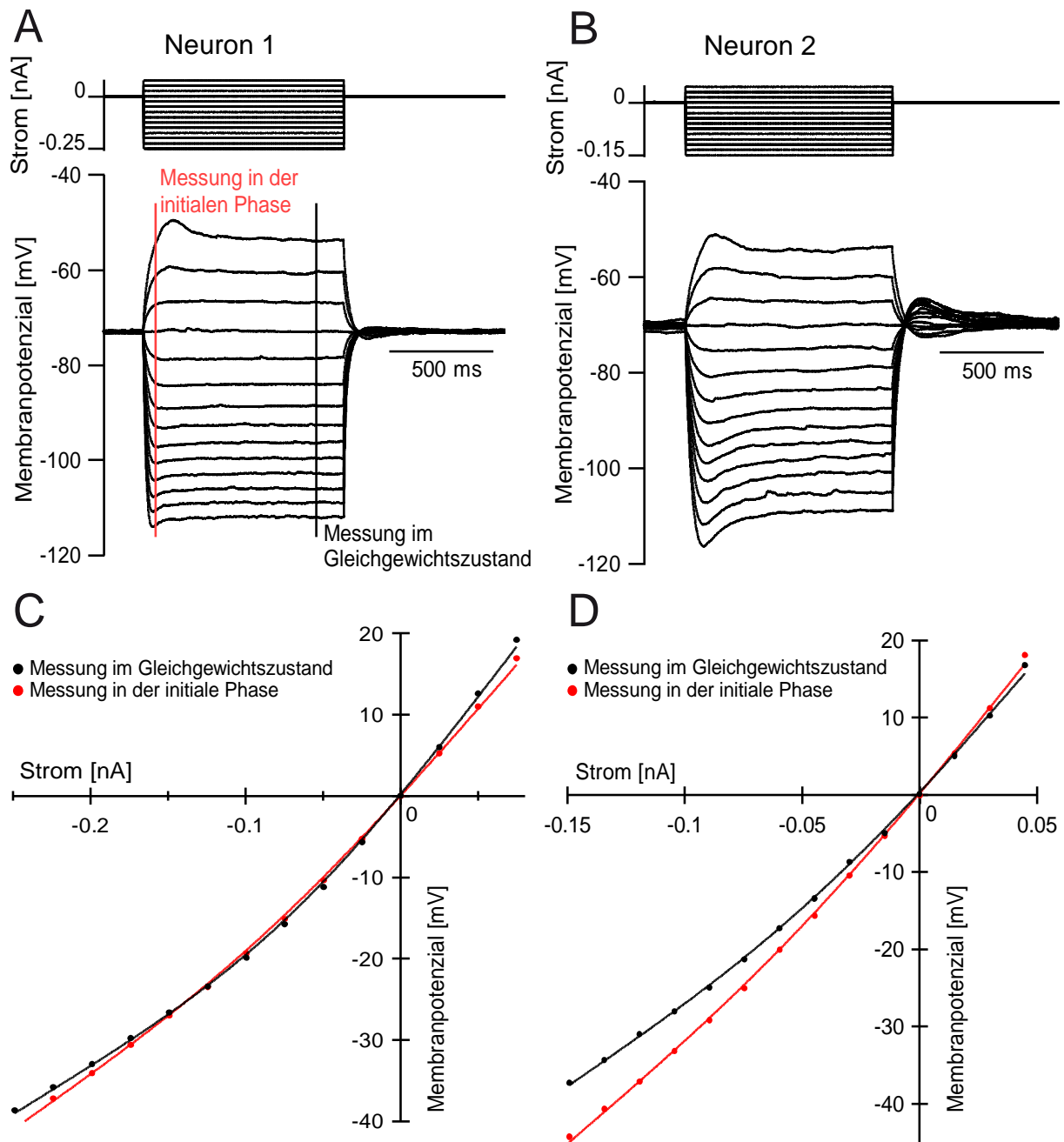


Abbildung 21.1: Strom-Spannungs-Beziehung von zwei GFP-positiven Neuronen der endopiriformen Population (EPP).

A) Darstellung der Reizstromstärke ( $\Delta I = 25$  pA, Dauer 1000 ms) und der unterschwelligen Spannungsantworten von Neuron 1.

B) Darstellung der Reizstromstärke ( $\Delta I = 15$  pA, Dauer 1000 ms) und der unterschwelligen Spannungsantworten von Neuron 2.

C) Strom-Spannungs-Kurve von Neuron 1. Die Messung in der initialen Phase in rot dargestellt, die Messung im Gleichgewichtszustand in schwarz.

D) Strom-Spannungs-Kurve von Neuron 2. Die Messung in der initialen Phase in rot dargestellt, die Messung im Gleichgewichtszustand in schwarz.

## GFP-negative Neurone

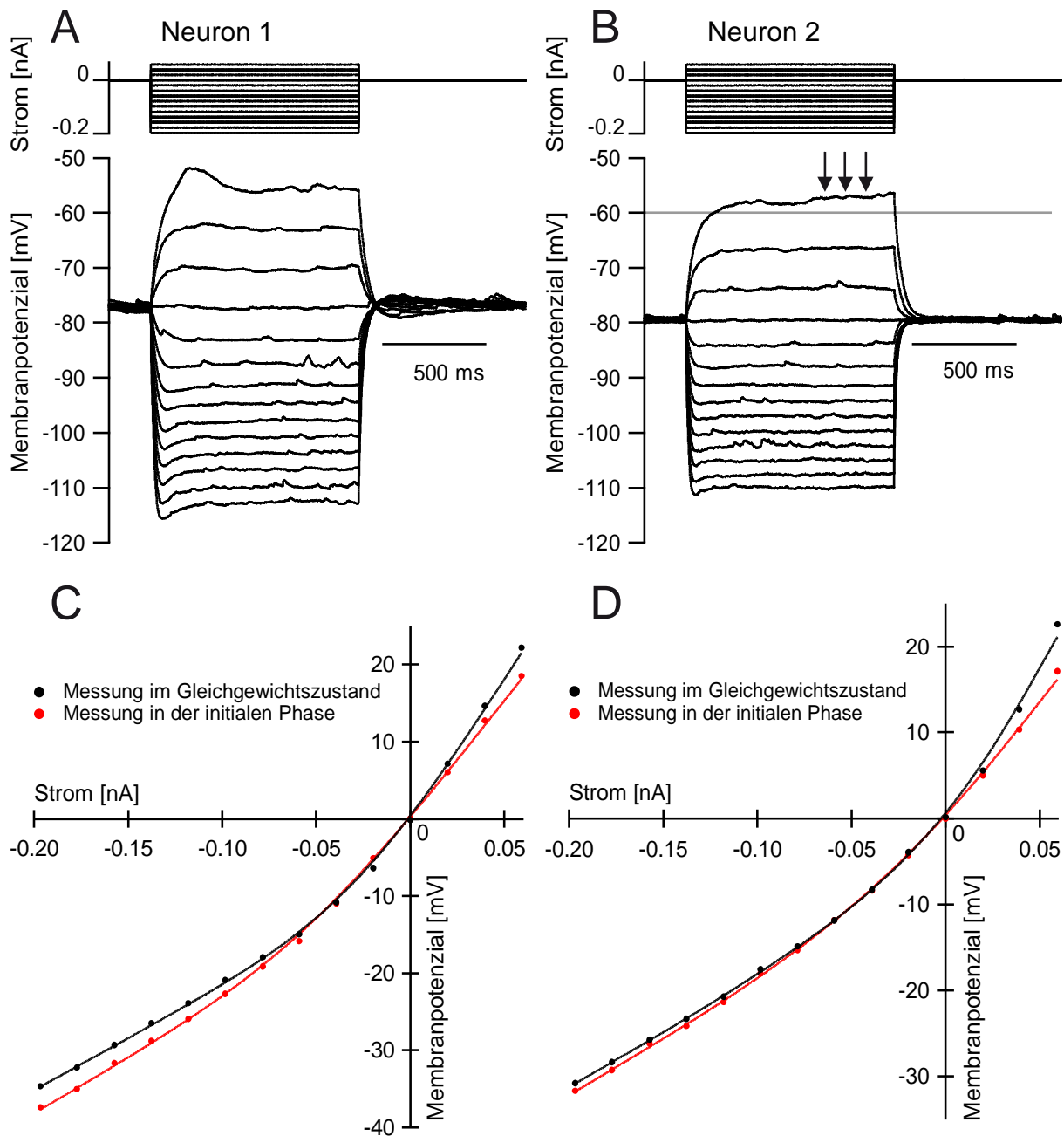


Abbildung 21.2: Strom-Spannungs-Beziehung von zwei GFP-negativen Neuronen der endopiriformen Population (EPP).

A) Darstellung der Reizstromstärke ( $\Delta I = 25$  pA, Dauer 1000 ms) und der unterschwelligen Spannungsantworten von Neuron 1.

B) Darstellung der Reizstromstärke ( $\Delta I = 15$  pA, Dauer 1000 ms) und der unterschwelligen Spannungsantworten von Neuron 2.

C) Strom-Spannungs-Kurve von Neuron 1. Die Messung in der initialen Phase in rot dargestellt, die Messung im Gleichgewichtszustand in schwarz.

D) Strom-Spannungs-Kurve von Neuron 2. Die Messung in der initialen Phase in rot dargestellt, die Messung im Gleichgewichtszustand in schwarz.

## GIN (links) und Pyramidenzelle (rechts)

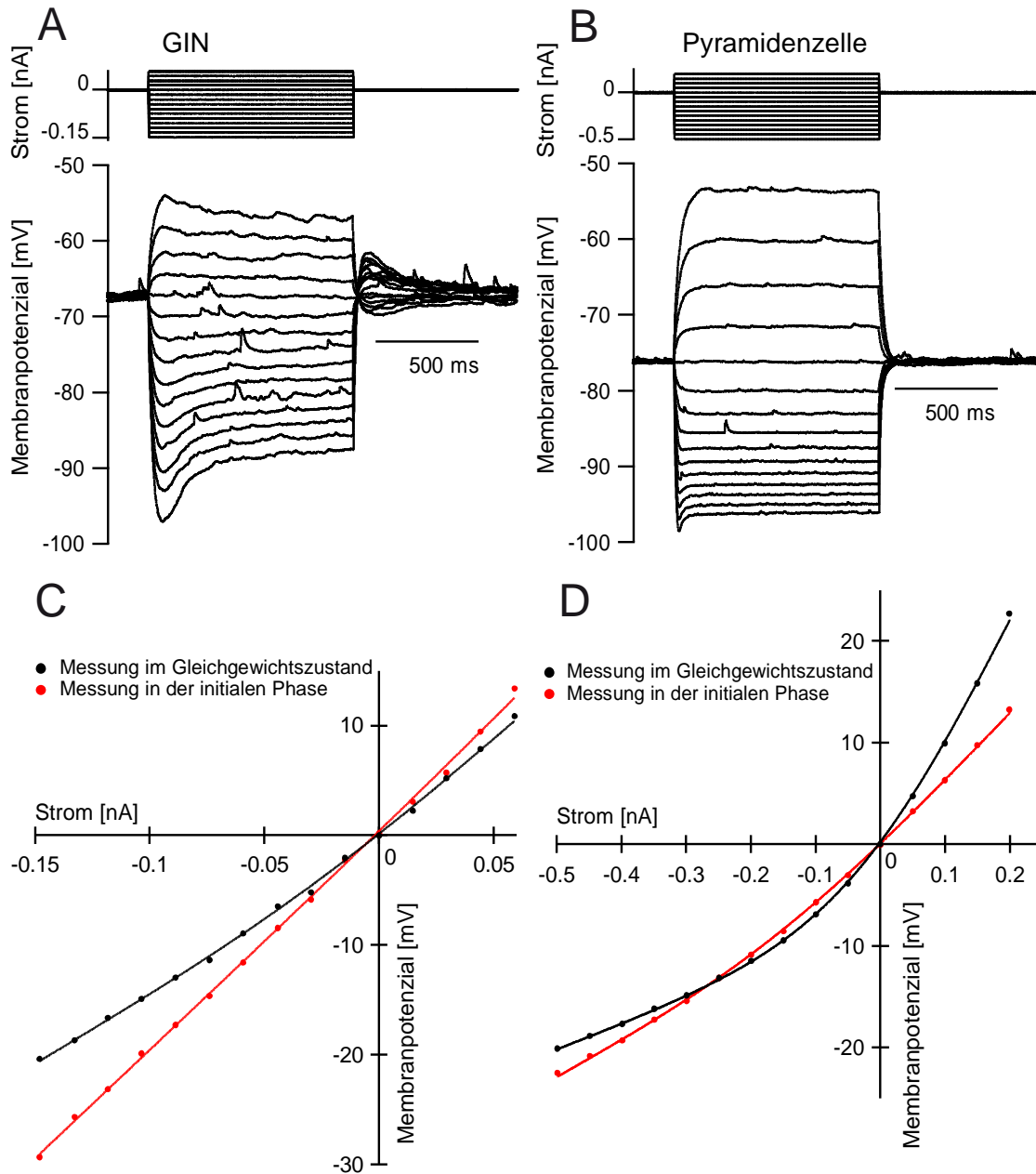


Abbildung 21.3: Strom-Spannungs-Beziehung eines GIN (links) und einer Pyramidenzelle (rechts) der corticalen Rindenschicht.

A) Darstellung der Reizstromstärke ( $\Delta I = 15 \text{ pA}$ , Dauer 1000 ms) und der unterschwelligen Spannungsantworten des GIN.

B) Darstellung der Reizstromstärke ( $\Delta I = 50 \text{ pA}$ , Dauer 1000 ms) und der unterschwelligen Spannungsantworten der Pyramidenzelle.

C) Strom-Spannungs-Kurve des GIN. Messung der initialen Phase in rot, Messung im Gleichgewichtszustand in schwarz.

D) Strom-Spannungs-Kurve der Pyramidenzelle. Messung der initialen Phase in rot, Messung im Gleichgewichtszustand in schwarz.

Mittels der erhaltenen Strom-Spannungs-Kurve konnte der Eingangswiderstand ermittelt werden. Hierzu wurden die jeweiligen Messpunkte (initiale und steady-state Spannungsantwort) der Strom-Spannungs-Beziehung mittels der „*smoothing spline*“ Funktion der Software Igor Pro 6 (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) interpoliert (Abb. 21.1 - 21.3 C und D). Durch Differenzierung der resultierenden Kurve konnte der Steigungswiderstand als Funktion des injizierten Stromes bestimmt werden (sog.  $R_N$ -Kurve).  $R_N$  wurde dann aus der  $R_N$ -Kurve bei  $X=0$  pA ermittelt.

Anhand der Strom-Spannungs-Kurven wurde neben dem Eingangswiderstand auch der Rektifikationskoeffizient bestimmt.

Eine Besonderheit der Strom-Spannungs-Beziehung, die fast ausschließlich bei einem Teil der GFP-negativen Neuronen der EPP auftrat, war eine kontinuierliche, langsam zunehmende Depolarisation in der Spannungsantwort nach Injektion eines unterschwelligen, depolarisierenden Strompulses (Abb. 21.2 B, Markierung mit Pfeilen). Solche Zellen zeigten meist auch, wie anschließend im Entladungsverhalten beschrieben, ein spätes erstes Aktionspotenzial (AP) als Antwort auf überschwellige Strompulse.

#### 4.6.3.1. Eingangswiderstand im Gruppenvergleich

Die untersuchten Zellgruppen zeigten deutliche Unterschiede bezüglich des Eingangswiderstandes  $R_N$ : In GIN war  $R_N$  mit  $359,6 \text{ M}\Omega \pm 170,2 \text{ SD}$  am höchsten, in Pyramidenzellen wurden die niedrigsten Werte mit  $128,4 \text{ M}\Omega \pm 43,1 \text{ SD}$  gemessen. GFP-positive Neurone hatten einen Eingangswiderstand von  $251,6 \text{ M}\Omega \pm 92,8 \text{ SD}$  und GFP-negative Neurone einen von  $325,4 \text{ M}\Omega \pm 125,2 \text{ SD}$  (Abb. 22 A). Pyramidenzellen zeigten sich signifikant verschieden zu allen Zellgruppen, zusätzlich waren GFP-positive Neurone signifikant verschieden zu den GIN (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).



#### 4.6.3.2. Vergleich des Rektifikationskoeffizienten

Der Rektifikationskoeffizient wurde im Gleichgewichtszustand (steady state) ermittelt. Hierfür wurde das Verhältnis des  $R_N$  bei  $I = 0$  pA geteilt durch den  $R_N$  gemessen, der bei Stromapplikation eine Membranspannung von etwa -100 mV (Abweichung 5%), hervorrief. Werte dieses Koeffizienten  $> 1$  in hyperpolarisierender Richtung bedeuteten dabei, dass eine Einwärtsgleichrichtung vorlag, Werte kleiner als 1 waren einer Auswärtsgleichrichtung gleichbedeutend. In keiner Zelle wurde ein Wert kleiner als 1 in hyperpolarisierender Richtung bestimmt, also waren alle Zellen Einwärtsgleichrichter. Sowohl die hyperpolarisierende als auch die depolarisierende Einwärtsgleichrichtung war bei den GIN (Abb. 21.3 C) im Vergleich zu den anderen Zellgruppen geringer ausgeprägt.

Im Gleichgewichtszustand war der Rektifikationsindex der jeweiligen Zellgruppen folgendermaßen: GFP-positive Neurone  $-1,7 \pm 0,4$  SD; GFP-negative Neurone  $-2,0 \pm 0,5$  SD; GIN  $-1,4 \pm 0,2$  SD; Pyramidenzellen  $-2,4 \pm 0,6$  SD (Abb. 22 B). Im Gleichgewicht zeigte der Rektifikationskoeffizient signifikante Unterschiede zwischen Pyramidenzellen und GFP-positiven Neuronen bzw. GIN sowie zwischen GFP-negativen Neuronen und GIN (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

#### 4.6.3.3. Untersuchung des Sag-Potenzials im Gruppenvergleich

Als Antwort auf stark hyperpolarisierende Strompulse zeigte ein Teil der Neurone außerdem ein sogenanntes „Sag-Potenzial“. Damit wird die verzögerte Abnahme der Strompuls-induzierten Spannung bezeichnet, die ca. 50-200 ms nach Beginn einer Strominjektion auftritt (siehe als Beispiel: Abb. 21.3 A). Dieser „Sag“ war je nach untersuchter Zellgruppe unterschiedlich stark ausgeprägt und zeitlich variabel. Für GIN ist er ein typisches Merkmal [Riedemann et al., 2018].

Hinsichtlich der Sag-Amplitude zeigte sich jede Gruppe signifikant unterschiedlich zu den GIN (Abb. 22 C), die mit  $8,8 \text{ mV} \pm 3,8$  SD die höchsten Amplituden erreichten (Abb. 21.3 C). Absteigend folgten darauf GFP-positive Neurone mit  $3,7 \text{ mV} \pm 1,5$  SD, Pyramidenzellen mit  $3,4 \text{ mV} \pm 3,1$  SD und GFP-negative Neurone mit  $2,5 \text{ mV} \pm 1,8$  SD. Untereinander wiesen die anderen Gruppen keine signifikanten Differenzen auf (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

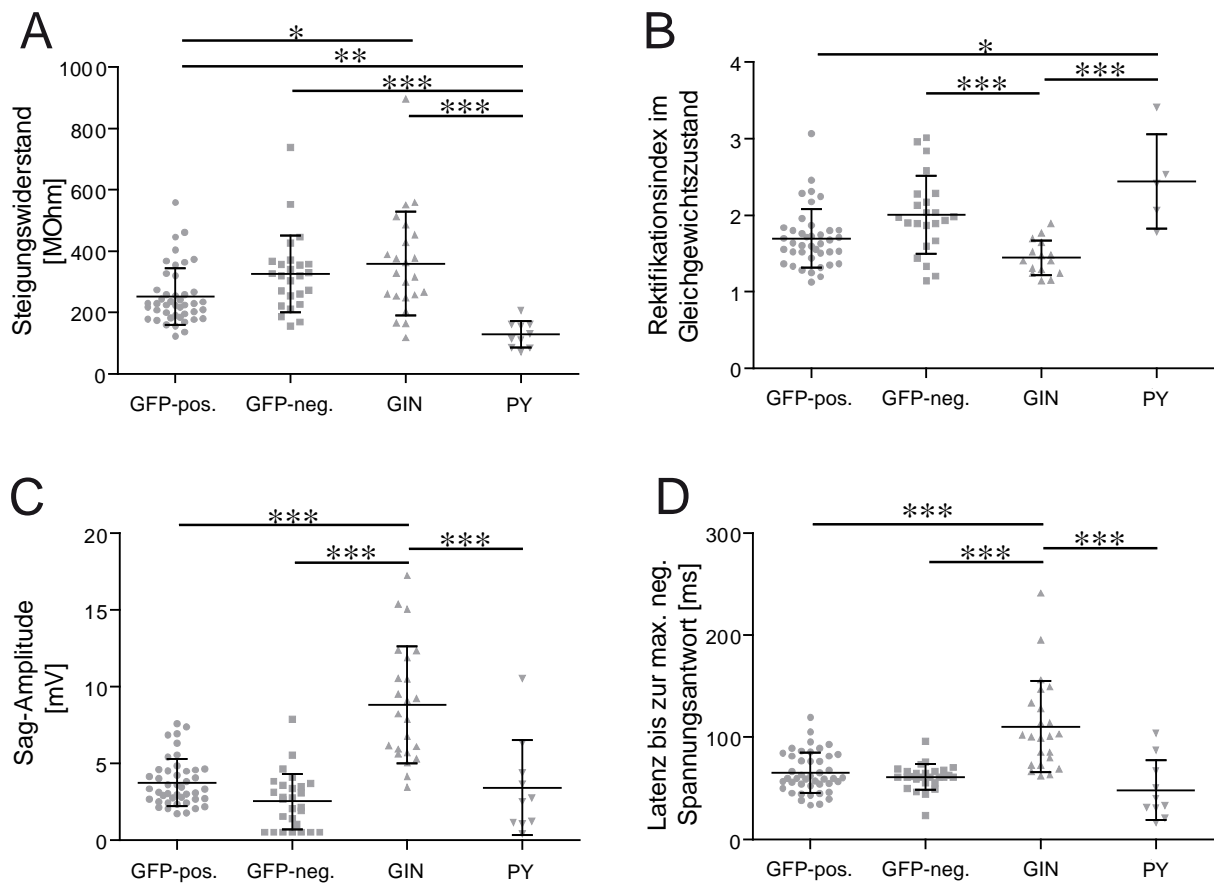


Abbildung 22: Darstellung des Steigungswiderstandes, des Rektifikationsindex im Gleichgewichtszustand, der Sag-Amplitude und der Latenz bis zur maximalen negativen Spannungsantwort im Gruppenvergleich (GFP-pos. = GFP-positive Neurone, GFP-neg. = GFP-negative Neurone, GIN und Pyramidenzellen = PY). Abbildung als scatter plot.

A) Darstellung des Eingangswiderstand [MOhm] mit SD.

B) Darstellung des Rektifikationsindex im Gleichgewichtszustand mit SD.

C) Darstellung der Amplitude des Sag-Potenzials [mV] mit SD.

D) Darstellung der Latenz bis zur maximal negativen (max. neg.) Spannungsantwort [ms] mit SD.

Außerdem wurde die Latenz bis zur maximal negativen Spannungsantwort nach hyperpolarisierendem Strompuls ermittelt (Abb. 22 D). Dabei zeigten GIN eine deutlich längere Latenz als alle anderen Zellgruppen (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn). Bei GIN wurde eine maximale Spannungsantwort erst nach  $110,5 \text{ ms} \pm 44,6 \text{ SD}$  erreicht. Bei GFP-positiven Neurone betrug die Latenzzeit  $65,3 \text{ ms} \pm 19,6 \text{ SD}$ , bei GFP-negative Neurone  $61,2 \text{ ms} \pm 12,6 \text{ SD}$  und bei Pyramidenzellen  $48,3 \text{ ms} \pm 29,2 \text{ SD}$ .

#### 4.6.4. Analyse der Eigenschaften des Aktionspotenzials der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population

Die Eigenschaften der Aktionspotenziale (AP) wurden nach Injektion eines Rechteckstrompulses (Dauer 1000 ms) untersucht. Bei mittlerer Stromstärke wurde aus der Entladung bei dem ersten AP die AP-Amplitude, die AP-Dauer, die Anstiegszeit des APs und die Abfallszeit des APs bestimmt. Die Amplitude konnte aus der Potentialdifferenz zwischen dem RMP und dem Amplitudenmaximum des APs ermittelt werden, die Dauer des Aktionspotenzials aus der Differenz zwischen Maximum und Minimum der ersten Ableitung [Bean, 2007]. Die Anstiegszeit wurde aus dem Zeitintervall zwischen dem 10%- und dem 90%-Wert der AP-Amplitude bestimmt. Die Abfallszeit entsprach dem Zeitintervall zwischen Amplitudenmaximum und dessen 60%-iger Reduktion.

Abb. 23 A zeigt ein einzelnes AP bei gerade überschwelliger Reizung, Abb. 23 B die erste Ableitung desselben APs nach der Zeit.

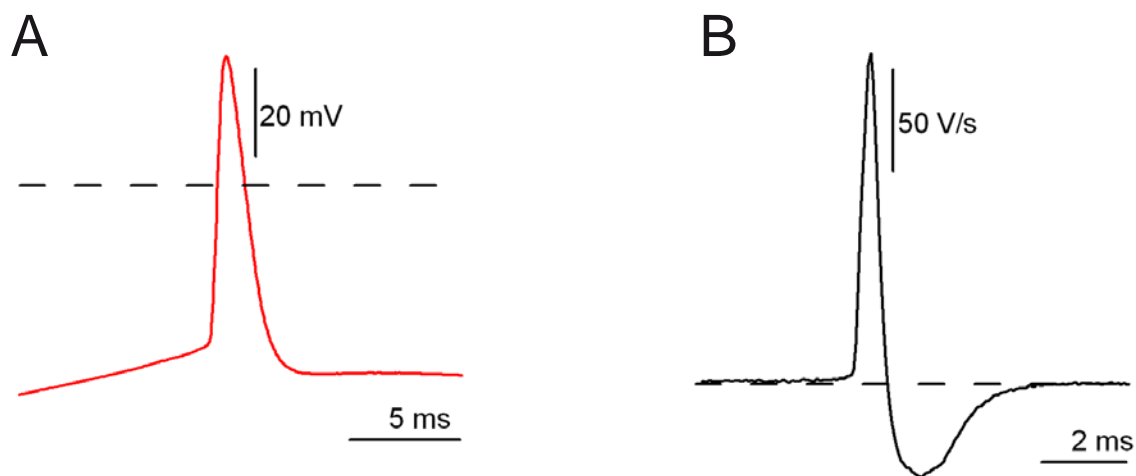


Abbildung 23: Darstellung eines einzelnen Aktionspotenzials sowie dessen erste Ableitung nach der Zeit (jeweils mit Nulllinie) eines GFP-positiven Neurons.

##### 4.6.4.1. Analyse des einzelnen Aktionspotenzial

Zunächst wurden die AP-Amplitude des einzelnen Aktionspotenzials bei GFP-positiven Neuronen, bei GFP-negativen Neuronen, Pyramidenzellen und GIN bestimmt. Hier erreichten GFP-positive Neurone eine AP-Amplitude von  $94,1 \text{ mV} \pm 8,8$

SD, GFP-negative Neurone wiesen eine AP-Amplitude von  $95,4 \text{ mV} \pm 12,5 \text{ SD}$  auf, Pyramidenzellen eines von  $101,9 \text{ mV} \pm 6,2$  und GIN erreichten Werte von  $76,8 \text{ mV} \pm 7,8$  (Abb. 24 A). Im Hinblick auf die AP-Amplitude zeigten sich GIN signifikant verschieden zu allen Zellgruppen (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

Die Dauer der APs betrug  $1,5 \text{ ms} \pm 0,3 \text{ SD}$  bei den GFP-positiven Neuronen. Bei GFP-negativen Neuronen wurde ein Wert von  $1,7 \text{ ms} \pm 0,3 \text{ SD}$  gemessen. Die AP-Dauer der Pyramidenzellen erreichte  $1,4 \text{ ms} \pm 0,3 \text{ SD}$  und die der GIN  $1 \text{ ms} \pm 0,1 \text{ SD}$  (siehe Abb. 24 B). Auch hier zeichneten sich die GIN bezüglich der AP-Dauer zu allen Vergleichsgruppen als signifikant verschieden aus (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

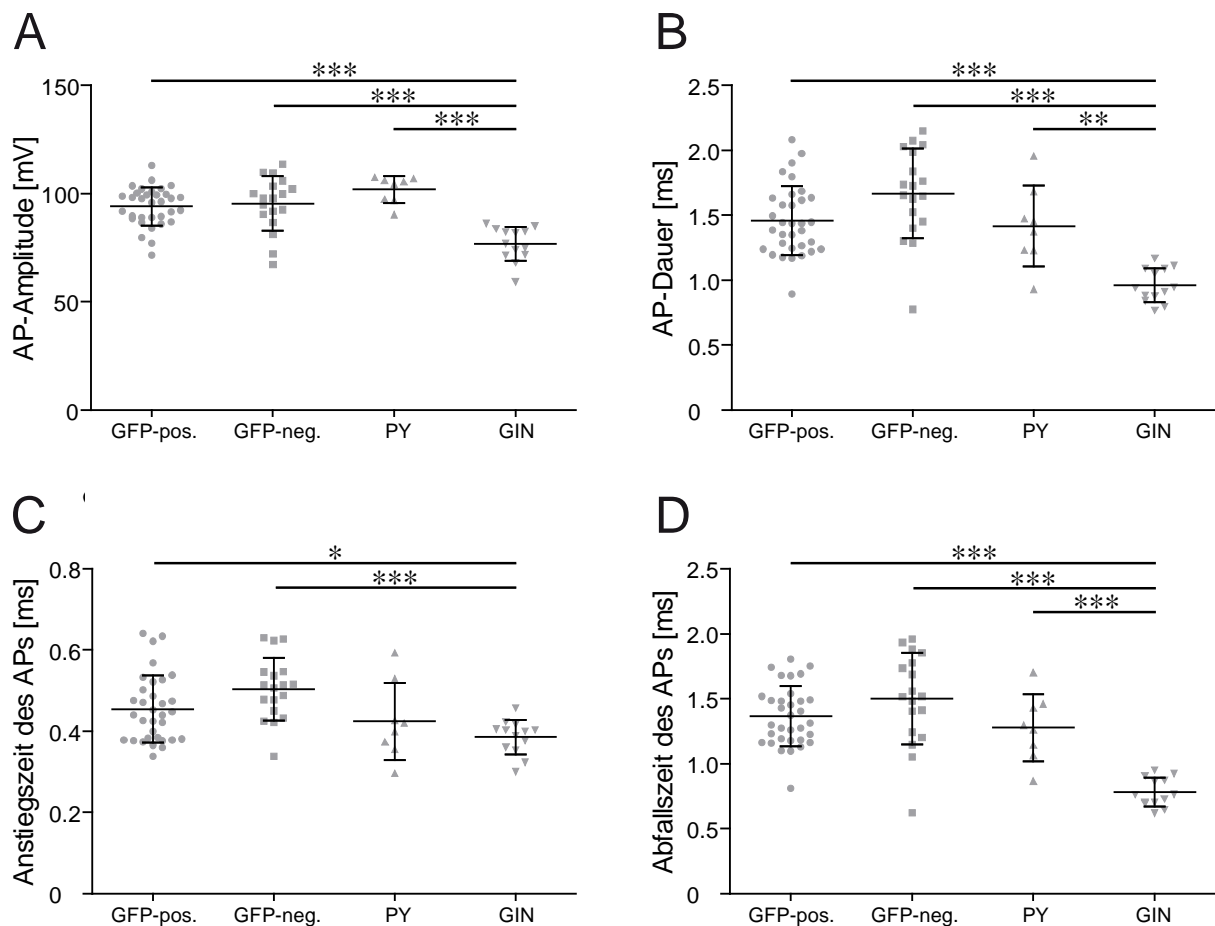


Abbildung 24: Die Eigenschaften des einzelnen Aktionspotenzials (AP) der GFP-positiven Neurone (GFP-pos.), der GFP-negativen Neurone (GFP-neg.), der Pyramidenzellen (PY) und der GIN. Darstellung als scatter plots.

- A) Darstellung der AP-Amplitude [mV] in den vier Gruppen mit SD.
- B) Darstellung der AP-Dauer [ms] in den vier Gruppen mit SD.
- C) Darstellung der Anstiegszeit des APs [ms] in den vier Gruppen mit SD.
- D) Darstellung der Abfallszeit des APs [ms] in den vier Gruppen mit SD.

Bei der Anstiegszeit des einzelnen APs erreichten GFP-positive Neurone einen Wert von  $0,5 \text{ ms} \pm 0,1 \text{ SD}$ , GFP-negative Neurone einen von  $0,5 \text{ ms} \pm 0,1 \text{ SD}$ . Das Ergebnis der Pyramidenzellen lag bei  $0,4 \text{ ms} \pm 0,1 \text{ SD}$ , während GIN mit  $0,4 \text{ ms} \pm 0 \text{ SD}$  den absolut niedrigsten Wert erreichten (siehe Abb. 24 C). Es zeigten sich GFP-positive Neurone und GFP-negative Neurone als signifikant verschieden zu den GIN (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

Zuletzt wurde auch die Abfallszeit des einzelnen APs ausgewertet. GFP-positive Zellen erreichten einen Wert von  $1,4 \text{ ms} \pm 0,2 \text{ SD}$ , GFP-negative Neurone  $1,5 \text{ ms} \pm 0,4 \text{ SD}$ . Die Pyramidenzellen wiesen eine Abfallszeit von  $1,3 \text{ ms} \pm 0,3 \text{ SD}$  auf, während GIN wiederum den niedrigsten Wert mit  $0,8 \text{ ms} \pm 0,1 \text{ SD}$  erreichten (vgl. Abb 24 D). Auch hier waren die GIN signifikant verschieden zu GFP-positiven Neuronen, GFP-negativen Neuronen und Pyramidenzellen (ANOVA für multiple Messungen mit Bonferronis multiplen Post-Tests)

Interessanterweise unterschieden sich GFP-positive Neurone in allen Aspekten (AP-Amplitude, AP-Dauer, Anstiegs- und Abfallszeit des APs) signifikant von den GIN. Genauso unterschieden sich Pyramidenzellen und GFP-negative Neurone von den GIN. Gleichzeitig zeigten GFP-positive Neurone, GFP-negative Neurone und Pyramidenzellen untereinander keinerlei Unterschiede (vgl. Abb. 24 A-D).

#### 4.6.4.2. *Dynamische Änderung des Aktionspotenzials bei der Entladung*

Im Anschluss an die Auswertung des einzelnen Aktionspotenzials sollte die dynamische Änderung der Aktionspotenziale während der Entladung bei mittlerer Stromstärke überprüft werden. Dazu wurde jeweils das erste, das zweite und letzte AP einer Entladung in jeder Gruppe (GFP-positive Neurone, GFP-negative Neurone, Pyramidenzellen und GIN) untersucht und zu allen anderen Gruppen verglichen. Die AP-Dauer, die Anstiegszeit und die Abfallszeit der APs wurden bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden normalisiert, in dem sie zum jeweiligen Wert des ersten Aktionspotenzials der jeweiligen Gruppe ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Amplitude wurde in dieser Auswertung nicht berücksichtigt, da die normalisierten Werte nur eine sehr geringe Verteilungsbreite von 95-105% zeigten und sich damit nicht signifikant unterschieden.

### Der Vergleich der AP-Dauer in den verschiedenen Zellgruppen

Zunächst wurde die AP-Dauer im Verlauf der Entladung untersucht: Bei GFP-positiven Neuronen stieg die AP-Dauer beim zweiten Aktionspotenzial auf  $153,6 \% \pm 3,9 \text{ SEM}$ , beim letzten Aktionspotenzial auf  $163,9 \% \pm 5,2 \text{ SEM}$ . Bei GFP-negativen Neurone wurden Werte von  $138,2 \% \pm 9,4 \text{ SEM}$  beim zweiten AP und  $149,1 \% \pm 10,5 \text{ SEM}$  beim letzten AP bestimmt. Pyramidenzellen erreichten beim zweiten AP  $121,9 \% \pm 10 \text{ SEM}$  und beim letzten AP  $116,5 \% \pm 9,7 \text{ SEM}$  des Ausgangswertes. Die GIN zeigten die geringste Veränderung. Der ermittelte Wert für das zweite AP lag bei  $106,6 \% \pm 5,3 \text{ SEM}$  und bei  $113,9 \% \pm 7,3 \text{ SEM}$  für das letzte AP.

Während die AP-Dauer bei GFP-positiven und GFP-negativen Neuronen beim zweiten und vor allem letzten AP der Entladung deutlich zunahm, war die Veränderung bei Pyramidenzellen und GIN weniger stark ausgeprägt (siehe Abb. 25 A). Es wurden signifikante Unterschiede bezüglich der AP-Dauer ermittelt: das zweite und das letzte AP der GFP-positiven Neurone unterschied sich signifikant vom zweiten und vom letzten AP der GIN. Genauso unterschieden sich das zweite und das letzte AP der GFP-positiven Neurone signifikant von der Entladung der Pyramidenzellen. GFP-negative Neurone unterschieden sich von Pyramidenzellen signifikant im Hinblick auf das letzte AP und von GIN bezüglich des zweiten und des letzten AP.

Insgesamt unterschied sich die Entladung der GFP-positiven Neurone bezüglich der AP-Dauer signifikant von GIN und von Pyramidenzellen, aber nicht von GFP-negativen Neuronen (Two-way ANOVA mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

### Der Vergleich der Anstiegszeit des APs über die Zellgruppen hinweg

Bei den GFP-positiven Neuronen erhöhte sich die Anstiegszeit während der Entladung auf  $141,6\% \pm 5,5 \text{ SEM}$  beim zweiten AP und auf  $140,7 \% \pm 5,8 \text{ SEM}$  beim letzten AP im Vergleich zum Ausgangswert des ersten APs. GFP-negative Neurone erreichten Werte von  $127,4 \% \pm 7,8 \text{ SEM}$  beim zweiten AP und von  $132,7 \% \pm 7,4 \text{ SEM}$  beim letzten AP. Die ermittelten Werte der Pyramidenzellen änderten sich in Bezug auf die Anstiegszeit am wenigsten: für das zweite AP wurden Werte von  $109,1 \% \pm 8,5 \text{ SEM}$  gemessen und für das letzte AP  $111,1 \% \pm 8,8 \text{ SEM}$ . Bei GIN wurden

Werte von  $110 \% \pm 4,8 \text{ SEM}$  für das zweite AP und  $126,5 \% \pm 7,6 \text{ SEM}$  für das letzte AP gemessen.

Im Verlauf der Entladung veränderte sich die Anstiegszeit am meisten bei den GFP-positiven Neuronen. Etwas geringer fiel diese Veränderung bei GFP-negativen Neuronen aus. Auch bei GIN kommt es zumindest beim letzten AP zu einer deutlichen Zunahme der Anstiegszeit des APs, während sich die Anstiegszeit bei den Pyramidenzellen am wenigsten änderte (vgl. Abb 25 B).

Die ermittelten Signifikanzen bezüglich der Anstiegszeit waren: bei GFP-positiven Neuronen zeigte das zweite und das letzte AP signifikante Unterschiede zum zweiten und letzten AP der Pyramidenzellen. Außerdem unterschied sich die Anstiegszeit des zweiten APs der GFP-positiven Neurone signifikant von der Anstiegszeit des zweiten APs der GIN. Auch hier unterschieden sich die GFP-positiven Neurone signifikant von GIN und Pyramidenzellen, nicht aber von GFP-negativen Neuronen (Two-way ANOVA mit Bonferronis multiplen Post-Tests).

#### Die Abfallszeit des APs im Gruppenvergleich

Zuletzt wurde die Abfallszeit des ersten APs in Relation zur Abfallszeit des zweiten und des letzten AP der Entladung gesetzt. Bei den GFP-positiven Neuronen stieg die Abfallszeit auf  $156,2 \% \pm 3,8 \text{ SEM}$  beim zweiten AP und auf  $174 \% \pm 5,7 \text{ SEM}$  beim letzten AP. Die ermittelten Werte bei GFP-negativen Neuronen waren  $141,6 \% \pm 10,8 \text{ SEM}$  beim zweiten AP und  $159,3 \% \pm 14 \text{ SEM}$  beim letzten AP. Pyramidenzellen erreichten Werte von  $124,9 \% \pm 10,2 \text{ SEM}$  beim zweiten AP und  $119,9 \% \pm 10 \text{ SEM}$  beim letzten AP.

GIN zeigten die geringste Veränderung der Abfallszeit. Das zweite AP erreichte einen Wert von  $105,5 \% \pm 5,5 \text{ SEM}$  und das letzte AP  $109,3 \% \pm 7,1 \text{ SEM}$ .

Wiederum zeigte sich bei den GFP-positiven und den GFP-negativen Neuronen die größte Veränderung. Die Abfallszeit stieg im Vergleich zum Ausgangswert stark, während dies bei Pyramidenzellen und GIN in deutlich geringerem Umfang geschah (siehe Abb. 25 C).

Im Vergleich der Abfallszeit über die Gruppen hinweg zeigte sich, dass sich das zweite und dritte AP der GFP-positiven Neurone signifikant vom zweiten und dritten AP der GIN unterschied. Das zweite und dritte AP der GFP-positiven Neurone unter-

schied sich außerdem signifikant vom zweiten und dritten AP der Pyramidenzellen. GFP-negative Neurone unterschieden sich von Pyramidenzellen signifikant im Hinblick auf das letzte AP und von GIN bezüglich des zweiten und des letzten APs.

Die Abfallszeit der GFP-positiven Neurone unterschied sich während der Entladung damit signifikant von GIN und Pyramidenzellen, aber nicht von GFP-negativen Neuronen (Two-way ANOVA mit Bonferronis multiplen Post-Tests)

#### Zusammenfassung zur Veränderung des Aktionspotenzials während einer Entladungsserie in den jeweiligen Gruppen

Insgesamt fiel auf, dass sich das Aktionspotenzial der GIN während der Entladung am wenigsten änderte, während es bei den GFP-positiven Neuronen zum deutlichsten Anstieg der AP-Dauer, der Anstiegszeit und der Abfallszeit der Aktionspotenziale kam. GFP-negative Neurone zeigten ebenfalls ausgeprägte Zunahmen dieser Werte. Bei Pyramidenzellen veränderte sich das Aktionspotenzial während der Entladung in etwas geringerem Umfang.

Sowohl GIN als auch Pyramidenzellen zeigten signifikante Unterschiede zu GFP-positiven Neuronen. GFP-positive und GFP-negative Neurone unterschieden sich nicht signifikant.



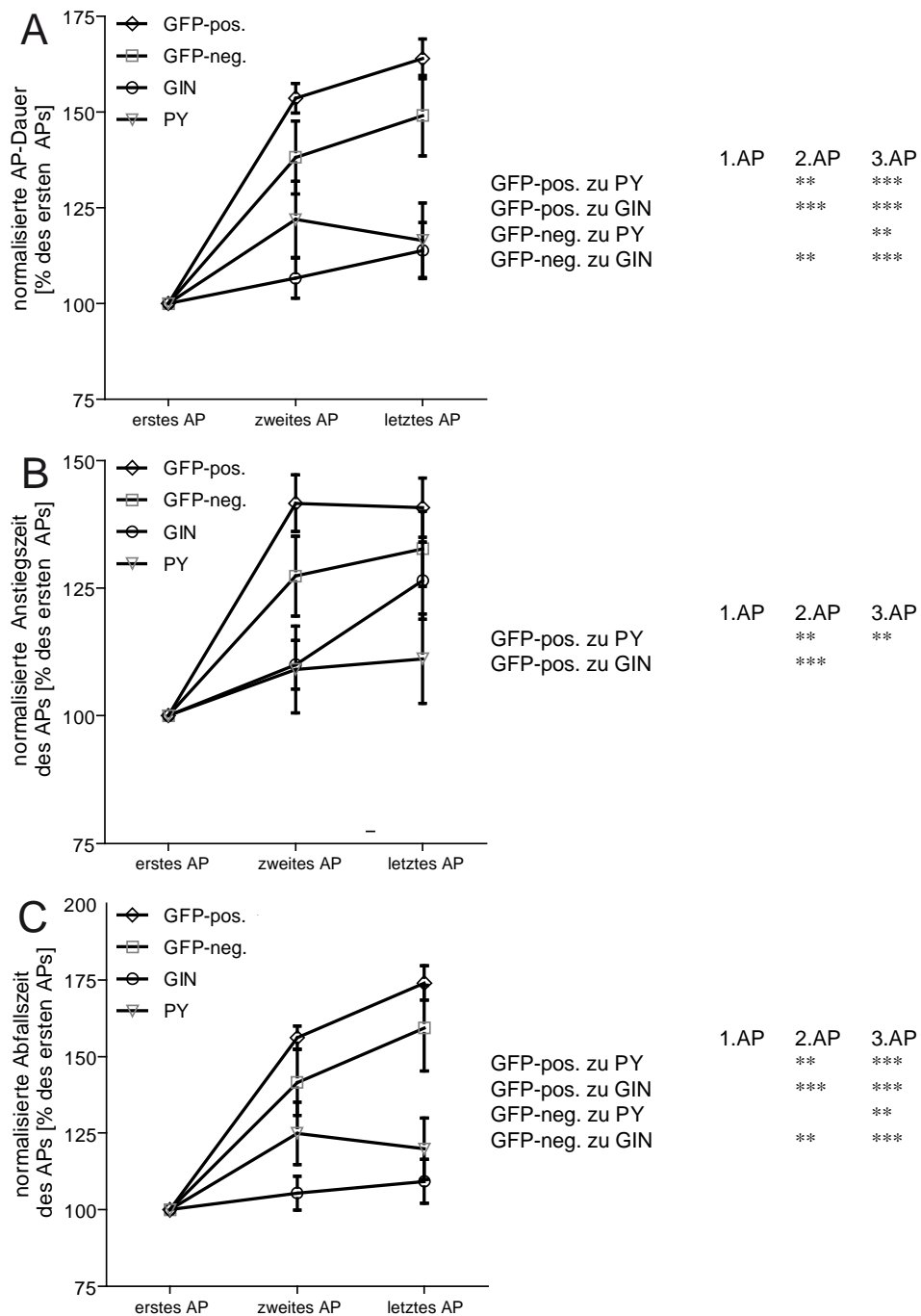


Abbildung 25: Die dynamischen Eigenschaften des ersten, zweiten und letzten Aktionspotenzials (AP) einer Entladungsserie von GFP-positiven Neuronen (GFP-pos.), GFP-negativen Neuronen (GFP-neg.), Pyramidenzellen und GIN als Liniendiagramm mit SEM.

A) Darstellung der normalisierten Dauer des ersten, zweiten und letzten APs [% des ersten APs].

B) Darstellung der normalisierten Anstiegszeit des ersten, zweiten und letzten APs [% des ersten APs].

C) Darstellung der normalisierten Abfallszeit des ersten, zweiten und letzten APs [% des ersten APs].

#### 4.6.5. Analyse des Entladungsverhaltens der GFP-positiven Neurone

Das Entladungsverhalten der untersuchten Neurone wurde durch Injektion zunehmend depolarisierender Rechteckstimpulse (Dauer: 1000 ms) in gleichbleibenden Amplitudenstufen ermittelt (Abb. 26.1 und 26.2 A). Zunächst erfolgte eine qualitative Auswertung hinsichtlich des Entladungsmusters. Dazu wurden die Stimpuls-induzierten Antworten als sog. „*raster plots*“ aufgetragen (Abb. 26 und 27 B). Es wurden 3 Gruppen gebildet [Riedemann et al., 2018]:

- Gruppe 1 bildeten „*kontinuierlich entladende Neurone*“, d.h. solche, die auf depolarisierende Stimpulse mit einer kontinuierlichen AP-Entladung ohne Unterbrechungen reagierten.
- „*Diskontinuierlich entladende Neurone*“ bildeten die Gruppe 2. Dabei handelte es sich um Neurone, die innerhalb einer einzelnen AP-Entladung längere Unterbrechungen zeigten.
- Gruppe 3 bildeten Neurone mit „*Burst*“-artiger Entladung (engl.: platzen). Solche Neurone zeigten bereits bei der ersten überschweligen Reizung eine hochfrequente Entladung von mehreren APs, die auf einem niederschweligen AP auflagen [Connors et al., 1990, Connors et al., 1982, Riedemann et al., 2018, Stewart et al., 1993].

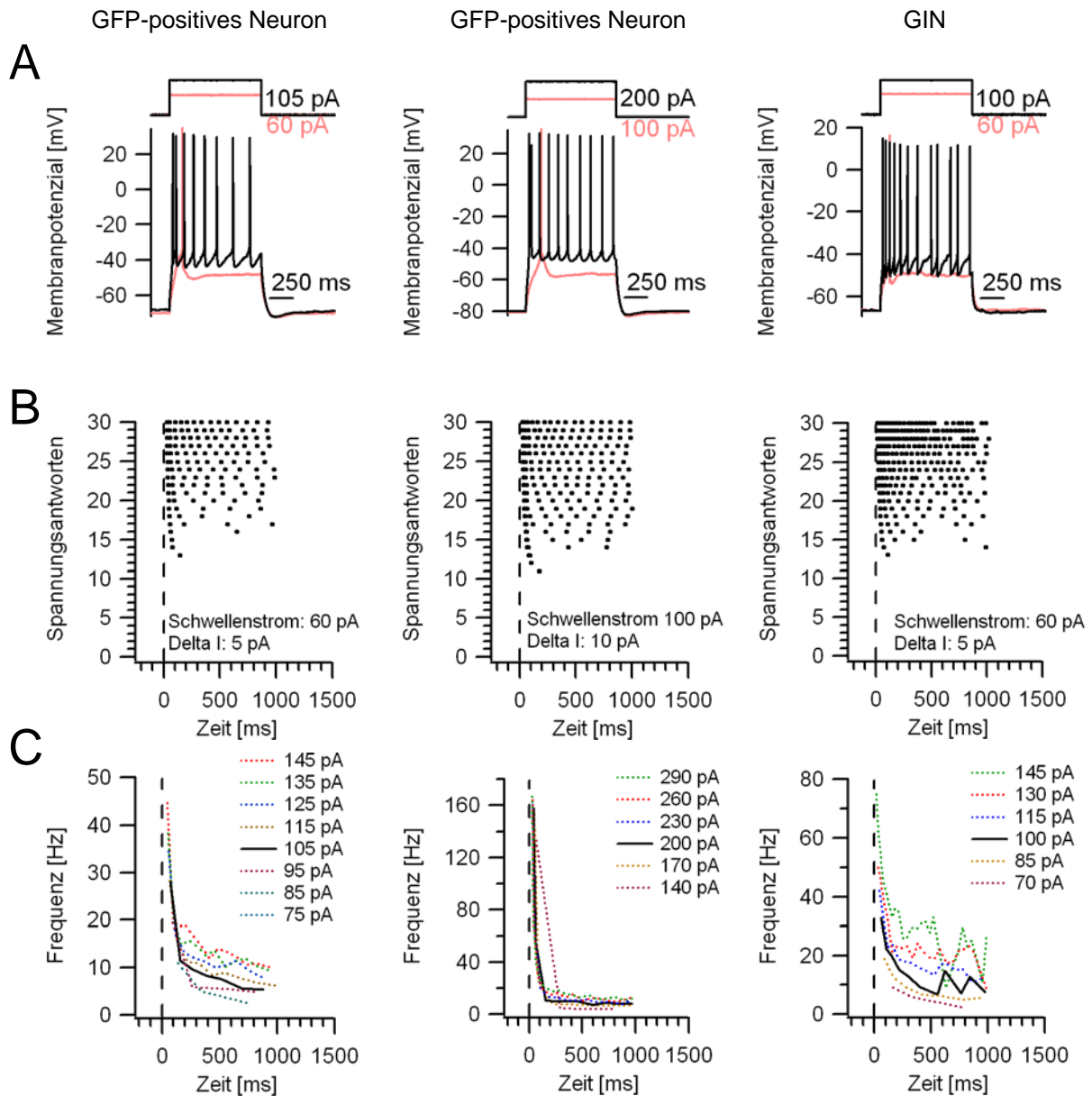


Abbildung 26.1: Darstellung zwei ausgewählter GFP-positiver Neurone der endopiriformen Population (EPP) im Vergleich zu einem GIN.

A) Darstellung der Stromstärke oben (erste überschwellige Stromstärke rot, mittlere Stromstärke schwarz, Dauer 1000 ms) und des Entladungsverhaltens unten (erste überschwellige Stromstärke rot, mittlere Stromstärke schwarz). Abgebildet sind zwei regulär entladende GFP-positive Neurone der EPP (links und Mitte), eine davon mit „doublettenartigem“ Entladungsverhalten, sowie ein regulär entladenden GIN (rechts).

B) Zugehörige Rasterplots der entsprechenden Zellen aus A.

C) Frequenz-Zeit-Diagramme der Neurone aus A bei ausgewählten Stromstärken (bis zu 8 Traces in unterschiedlicher Farbdarstellung) zeigen das Frequenzverhalten im Zeitverlauf der Entladung.

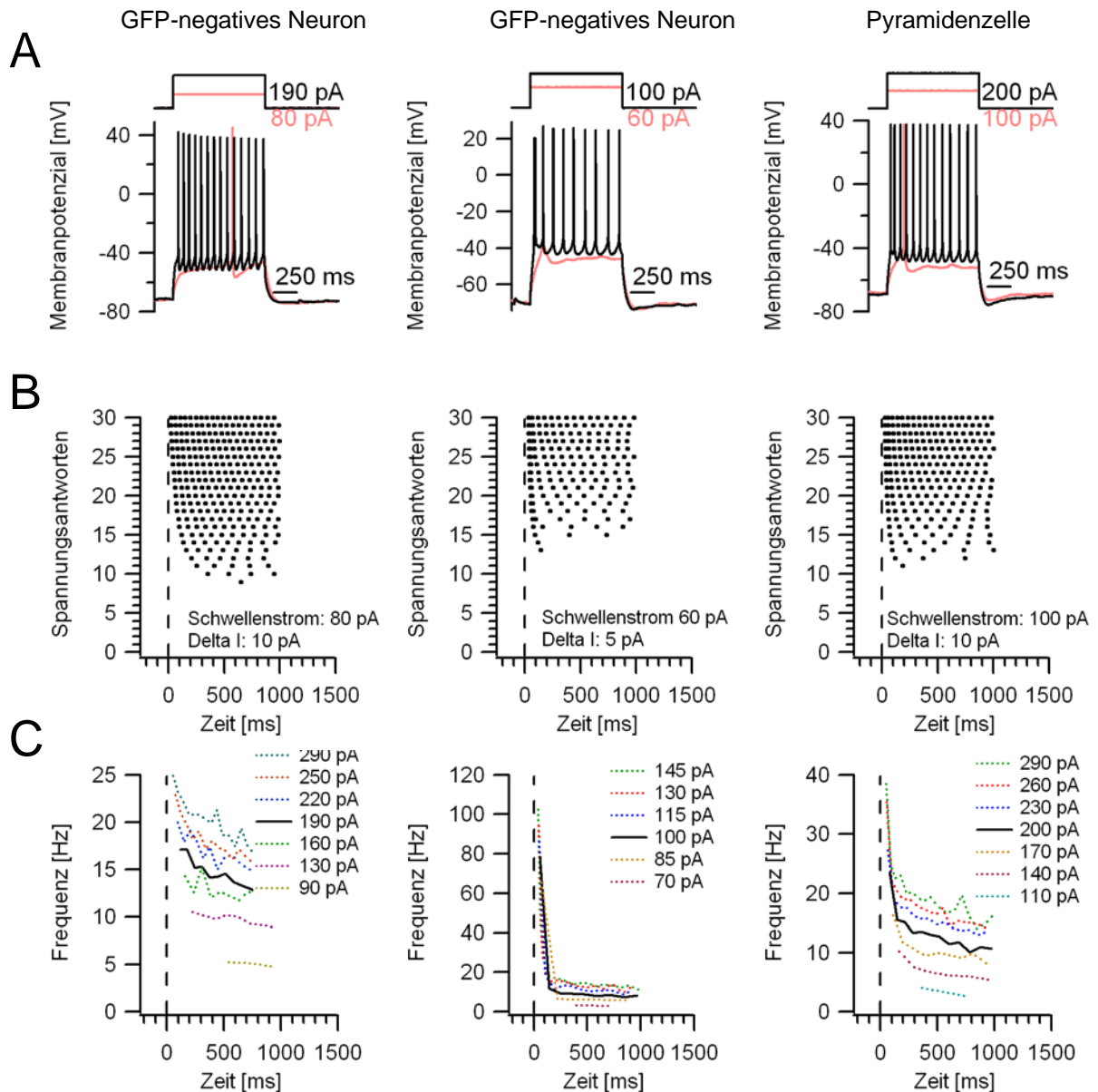


Abbildung 26.2: Darstellung des Entladungsverhalten zwei ausgewählter GFP-negativer Neurone der endopiriformen Population (EPP) im Vergleich zu einer Pyramidenzelle

A) Darstellung der Stromstärke oben (erste überschwellige Stromstärke rot, mittlere Stromstärke schwarz, Dauer 1000 ms) und des Entladungsverhaltens unten (erste überschwellige Stromstärke rot, mittlere Stromstärke schwarz). Abgebildet sind zwei regulär entladende GFP-positive Neurone der EPP (links und Mitte), eine davon mit „doublettenartigem“ Entladungsverhalten, sowie eine regulär entladende Pyramidenzelle (rechts).

B) Zugehörige Rasterplots der entsprechenden Zellen aus A.

C) Frequenz-Zeit-Diagramme der Neurone aus A bei ausgewählten Stromstärken (bis zu 7 Traces in unterschiedlicher Farbdarstellung).

Tabelle 9 zeigt das Entladungsverhalten von 34 untersuchten GFP-positiven Neuronen, 20 GFP-negativen Neuronen, 14 GIN und 8 Pyramidenzellen. Alle Pyramidenzellen zeigten eine kontinuierliche Entladung im Sinne regulär entladender Neurone [McCormick et al., 1985]. Echtes „burst“-artiges Verhalten trat nicht auf. Dieses Phänomen wurde so bei keinem der GFP-positiven Neurone beobachtet. Allerdings zeigten 20 von 34 Neurone eine „doublettenartige“ Entladung, d.h. das zweite AP, manchmal auch noch das dritte AP, setzte sich bei hohen Strompulsen direkt auf das erste AP auf.

So konnte bei solchen Neuronen eine hohe initiale Entladungsfrequenz von über 100 Hz gemessen werden. 6 von 18 GFP-negativen Neuronen zeigten dasselbe Verhalten sowie 1 der 8 untersuchten Pyramidenzellen.

	<b>GFP-pos.</b>	<b>GFP-neg.</b>	<b>GIN</b>	<b>PY</b>
kontinuierlich	30 (88,2%)	18 (90%)	10 (71,4%)	8 (100%)
diskontinuierlich	4 (11,8 %)	2 (10%)	4 (28,6%)	0 (0%)

Tabelle 9: Kontinuität des Entladungsverhaltens der vier Zellgruppen (GFP-positive Neurone = GFP-pos., GFP-negative Neurone = GFP-neg., Pyramidenzellen = PY und GIN)

#### 4.6.5.1. Die Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial

Im Zusammenhang mit der Entladung wurde auch die Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial bestimmt. Es ergab sich aus der zeitlichen Differenz zwischen Beginn der Stromapplikation und dem Auftreten des ersten APs. Folgende Latenzen bis zum Auftreten der ersten APs wurden gemessen (Abb. 27 A): Pyramidenzellen: 192,6 ms  $\pm$  136,6 SD; GFP-positive Zellen der EPP: 190,3 ms  $\pm$  217,5 SD; GFP-negative Zellen der EPP: 386,2 ms  $\pm$  300,3 SD; GIN: 159,8 ms  $\pm$  142,6 SD (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Test nach Dunn,  $p = 0,0359$ ).

In der Gruppe der GFP-positiven und der GFP-negativen Neurone der EPP deuteten sich jeweils zwei Untergruppen innerhalb einer Gruppe an: solche mit einer durchschnittlichen Latenz und solche mit einer deutlich erhöhten Latenzzeit bis zum ersten AP. Interessanterweise konnte eine positive Korrelation zwischen der Latenz bis zum ersten AP und dem Ausmaß einer depolarisierenden Einwärtsgleichrichtung gefunden werden (vgl. Abb. 21.3 C): solche Zellen, die nach Injektion eines unterschwelli-

gen, depolarisierenden Strompulses eine deutliche Einwärtsgleichrichtung aufwiesen, zeigten eine deutlich verlängerte Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial.

#### 4.6.5.2. Untersuchung der Maximalfrequenz

Zu den quantitativ ausgewerteten Parametern zählte auch die Maximalfrequenz, die aus dem zeitlichen Abstand zwischen erstem und zweitem AP bestimmt wurde (Interspike Intervall,  $ISI_1$ ).

Aus Abbildung 27 B geht hervor, dass die Maximalfrequenz der GFP-positiven Neurone 89,3 Hz ( $\pm 41,9$  SD) erreichte. GIN folgten mit 86,5 Hz ( $\pm 26,7$  SD). GFP-negative Neurone erreichten 60,6 Hz ( $\pm 35,1$  SD), während Pyramidenzellen mit 51,2 Hz ( $\pm 32,6$  SD) den niedrigsten Wert aufwiesen. Es zeigte sich, dass die Daten von GFP-positiv und GFP-negativen Zellen nicht normalverteilt waren. Grund dafür ist die „doublettenartige“ Entladung bei einem Teil der GFP-positiven und GFP-negativen Neurone, die deutlichen Einfluss auf die maximale Entladungsfrequenz der Neurone nahm. Die Werte im Gruppenvergleich waren nicht signifikant verschieden (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Test nach Dunn,  $p = 0,0068$ ).

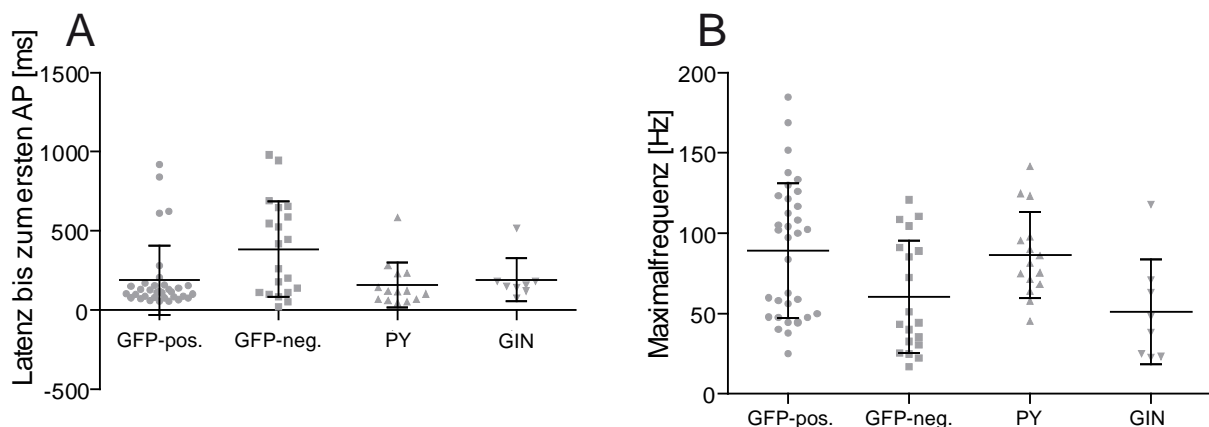


Abbildung 27: Darstellung der Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial (AP) und der Maximalfrequenz im Gruppenvergleich. Darstellung als scatter plot.

A) Darstellung der Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial (AP) in Millisekunden [ms] für GFP-positive, GFP-negative Neurone, Pyramidenzellen (PY) und GIN.

B) Darstellung der Maximalfrequenz (entspricht 1 Sekunde dividiert durch das erste Interspike Intervall) in Hertz [Hz] für GFP-positive, GFP-negative Neurone, Pyramidenzellen (PY) und GIN.

#### 4.6.5.3. *Änderung der Entladungsfrequenz während eines einsekündigen Strompulses*

Im Rahmen der Untersuchung des Entladungsverhaltens wurden sog. Frequenz-Zeit-Diagramme erstellt, wobei der Kehrwert der Interspike Intervalle gebildet (i.e.: Frequenz) und gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abb. 26.1 und 26.2 C). In fast allen abgeleiteten Zellen war eine deutliche Abnahme der initialen Entladungsfrequenz ( $ISI_1$ ) über die Zeit zu beobachten. Dieses Verhalten bezeichnet man als Adaptation. Um diese Abnahme der Entladungsfrequenz quantifizieren zu können, wurden die Interspike-Intervalle (ISI) der vier Zellgruppen zueinander ins Verhältnis gesetzt.  $ISI_1$  wurde jeweils durch  $ISI_2$  (Zeitintervall zwischen dem zweitem und drittem AP), durch  $ISI_{stst}$  (Zeitintervall zwischen den APs im steady state: alle APs in den letzten 300 ms einer Entladung) und durch  $ISI_{total}$  (gemitteltetes Zeitintervall aller ISIs) geteilt und die bestimmten Werte für alle Gruppen in Abbildung 28 übertragen. Wie zu sehen war, zeigte der jeweils ermittelte Quotient ( $ISI_1/ISI_2$ ,  $ISI_1/ISI_{stst}$ ,  $ISI_1/ISI_{total}$ ) zwischen den Gruppen deutliche Unterschiede (Abb. 28). Die ermittelten Werte für  $ISI_1/ISI_2$  waren für GFP-positiven Neurone  $2,5 (\pm 1,3 \text{ SD})$ , für GFP-negative Neurone  $2,1 (\pm 1,7 \text{ SD})$  für GIN  $1,3 (\pm 0,2 \text{ SD})$  und für Pyramidenzellen  $1,6 (\pm 0,4 \text{ SD})$ . Der Quotient der GFP-positiven Neurone war signifikant verschieden zum Quotienten der GIN (Abb. 28). Andere Signifikanzen wurden nicht ermittelt (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

Der Quotient von  $ISI_1/ISI_{stst}$  für GFP-positive Neurone erreichte Werte  $5,8 (\pm 4,8 \text{ SD})$ . GFP-negative Neurone maßen  $3,4 (\pm 3,2 \text{ SD})$ , GIN  $4,9 (\pm 3,1 \text{ SD})$  und Pyramidenzellen  $2,5 (\pm 0,8 \text{ SD})$ . Dies bedeutete, dass die Entladungsfrequenz im steady state (entspricht  $ISI_{stst}$ ) im Vergleich zur initialen Entladungsfrequenz in allen Gruppen deutlich abnahm, da das  $ISI_{stst}$  den Nenner des Quotienten bildete. Hier zeigten auch die GIN eine deutliche Zunahme des Quotienten. Pyramidenzellen erreichten den niedrigsten Wert, was durch die niedrige Maximalfrequenz der Zellen zu erklären ist (Abb 27 B). Maximalfrequenz ( $ISI_1$ ) und steady state Frequenz waren also bei Pyramidenzellen weniger stark unterschiedlich als bei GIN und GFP-positiven Neuronen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn).

Der Quotient  $ISI_1/ISI_{total}$  war signifikant unterschiedlich zwischen den GFP-positiven Neuronen und den GFP-negativen Neuronen (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests

nach Dunn). Die ermittelten Werte waren  $3,0 (\pm 1,5 \text{ SD})$  für GFP-positive Neurone;  $2,1 (\pm 1,4 \text{ SD})$  für GFP-negative Neurone;  $2,3 (\pm 0,6 \text{ SD})$  für GIN und  $1,8 (\pm 0,5 \text{ SD})$  für Pyramidenzellen (Abb. 28).

Aus dieser Analyse geht hervor, dass sich die Frequenz zwischen erstem und zweitem Interspike Intervall bei den GIN am wenigsten reduzierte, bei den GFP-positiven Neuronen am meisten. GFP-positive Neurone und GFP-negative Neurone erreichten hier hohe Werte aufgrund der „doublettenartigen Entladung“, die für eine hohe initiale Entladungsfrequenz ( $\text{ISI}_1$ ) und eine sehr viel geringere Frequenz des  $\text{ISI}_2$  sorgte.

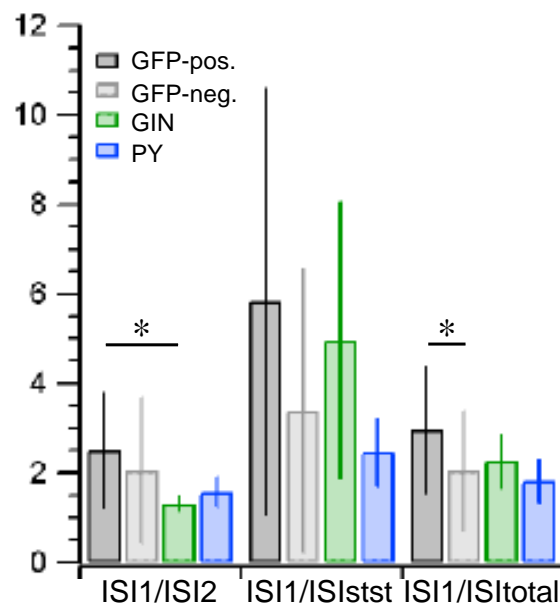


Abbildung 28: Darstellung des Quotienten verschiedener Interspike Intervalle im Gruppenvergleich (GFP-pos. = GFP-positive Neurone in dunkelgrau, GFP-neg. = GFP-negative Neurone in hellgrau, PY = Pyramidenzellen in blau und GIN in grün) als Blockdiagramm.

Links: Darstellung des Quotienten des ersten Interspike Intervalls ( $\text{ISI}_1$ ) zum zweiten Interspike Intervall ( $\text{ISI}_2$ ) in den vier Zellgruppen.

Mitte: Darstellung des ersten Interspike Intervalls zum Interspike Intervall im Gleichgewichtszustand ( $\text{ISItst}$ ) in den vier Zellgruppen.

Rechts: Darstellung des ersten Interspike Intervalls zur gemittelten Totalfrequenz ( $\text{ISItotal}$ ) in den vier Zellgruppen.



## 4.7. Zusammenfassung der elektrophysiologischen Daten

Es wurden sowohl passive als auch aktive Membraneigenschaften von GFP-positiven und GFP-negativen Neuronen der EPP, GIN und Pyramidenzellen miteinander verglichen. Außerdem erfolgte ein Vergleich der AP-Entladung sowie der Kinetik einzelner APs. Nach Immunhistochemie und Morphologie zeigten sich auch in der Elektrophysiologie Merkmale, die nicht den „echten“, bisher beschriebenen GIN entsprechen.

GFP-positive Neurone unterschieden sich in den passiven Membraneigenschaften von Pyramidenzellen hinsichtlich der Zellkapazität, von GIN hinsichtlich des RMP.

In der Strom-Spannungs-Beziehung zeigte sich, dass sich die GFP-positiven Neurone der EPP deutlich von den GIN des somatosensorischen Cortex unterschieden und mehr dem Verhalten von Pyramidenzellen und GFP-negativen Neuronen der EPP ähnelten.

In Übereinstimmung damit zeigte die Auswertung einzelner Aktionspotenziale in den unterschiedlichen Zelltypen, dass sich die Gruppe der GIN deutlich von den anderen drei Zellgruppen (GFP-positive Neurone, GFP-negative Neurone und Pyramidenzellen), die untereinander keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Die Entladungseigenschaften der einzelnen Zellgruppen waren innerhalb der gebildeten Gruppen bereits sehr unterschiedlich, so dass im Gruppenvergleich aufgrund der großen Variabilität keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten.

## 5. Diskussion

### 5.1. Methodenwahl

#### 5.1.1. Immunhistochemie und Zellzahlbestimmung

Ein Teil der Arbeit basierte auf immunhistochemischen Färbungen zur Auswertung des neurochemischen Profils der GFP-positiven Neurone der EPP. Verschiedene Faktoren beeinflussen aber den Erfolg dieser Methode. Maßgeblich sind die Spezifität des Antikörpers, die Vorbehandlung der Gewebeschnitte, die Aufbewahrung, verwendete Reagenzien sowie Temperatur- und Zeiteinflüsse.

Unspezifische Gewebereaktionen wurden soweit wie möglich durch vorausgehende Verdünnungsreihen vermieden. Dadurch konnte die optimale Antigen-Antikörper-Reaktivität ermittelt werden. Bezüglich der Zeitspanne, Temperaturen und Aufbewahrung wurde streng auf die Vorgaben des Herstellers und eigene Erfahrungen geachtet, um unspezifische Antikörperreaktionen zu minimieren.

Die räumliche Ausbreitung GFP-positiver Neurone im piriformen Cortex und der darunter befindlichen GFP-positiven Neurone im claustrum-endopiriformen Komplex wurde untersucht, indem jeder zehnte coronale Schnitt einer rostro-caudalen Schnittserie untersucht wurde. So konnte die Ausbreitung der Neurone auch in der sagittalen Ebene beurteilt werden. Zusätzlich wurde in horizontalen Schnitten gezeigt, dass die Ausbreitung der GFP-positiven Neuronenpopulation in sich homogen erschien und für diese Untersuchungen als ein zusammenhängendes Areal zusammengefasst werden konnte (vgl. Abb. 4 und 5).

Um die Zellzahlen im piriformen Cortex und der darunter befindlichen EPP standardisiert und neutral auswerten zu können, wurde eine Gitterstruktur aus 3 gleich großen Anteilen entworfen, die eine objektive Zählung ermöglichte (vgl. Abb. 6). Auf eine stereologische Auswertung der Zellzahlen wurde verzichtet, da zum Zeitpunkt der Untersuchung Unklarheit über die anatomischen Grenzen der EPP herrschte.

Bei Auszählung von Neuronen innerhalb der EPP mit 40-facher Vergrößerung wurde darauf geachtet, keine Abbildungen in den Randgebieten der EPP aufzunehmen, um die Aussagekraft der Daten nicht zu vermindern.

Bei Auswertung der hier gewonnenen Untersuchungsergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass keine Gesamtzahlen anhand neuronaler Zellmarker wie NeuN be-

stimmt wurden. Zum Verständnis der Ergebnisse wird deswegen nochmal betont, dass die berechneten Prozentzahlen sich nicht auf die Gesamtzahl aller vorhandenen Neuronen in dem untersuchten Gebiet bezog, sondern nur die Relation der einzelnen Neuronengruppen zueinander darstellte. Welchen Anteil die GFP-positiven und die GFP-negativen Neuronen an der Gesamtheit aller in diesem Kerngebiet vorhandenen Zellen darstellten, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

### **5.1.2. Morphologische Untersuchungsmethoden**

Zur Analyse der Morphologie GFP-positiver Neurone der EPP wurden einzelne Zellen in einem 300 µm dicken, akuten Gewebeschnitt mit Biocytin befüllt und anschließend rekonstruiert. Die Rekonstruktion bot eine einfache Möglichkeit solche Zellen darzustellen, die auch elektrophysiologisch charakterisiert worden waren. Obwohl die Rekonstruktion in zweidimensionaler Ebene stattfand, wurde die dritte Ebene durch die Anzahl der Bildstapel (Z-Ebene) festgehalten. Dadurch wurde es ermöglicht, die Ausdehnung der Zellen in der dritten Dimension zu erfassen und den Verlauf dendritischer und axonaler Fortsätze zu verfolgen. Dies war gerade für GFP-positive Neurone durchaus relevant, da bei einem Teil dieser Neurone der Dendritenbaum eine große Ausdehnung in der Z-Achse erreichte (zwischen 150-200 µm).

Die Morphologie einiger Biocytin-injizierter Zellen konnte nicht vollständig dargestellt werden. Mögliche Gründe dafür waren, dass die Dauer der elektrophysiologischen Ableitung nicht ausreichte, um die Zelle und ihre Fortsätze komplett mit Biocytin zu füllen, dass sich eine Zelle zu nahe am Schnitttrand der Gewebepreparation befand und Fortsätze deswegen abgeschnitten waren oder dass eine Zelle während der Ableitung starb. Außerdem waren durch die Fixation in PFA oder das Einbetten auf dem Objektträger Verzerrungen am Schnitt möglich, die zu einer Veränderung der Zellform führen könnten. Bei der manuellen Rekonstruktion wurde deshalb großer Wert darauf gelegt, nur solche Zellen auszuwählen, die sich möglichst vollständig darstellten, um Fehler zu minimieren. 10 GFP-positive Neurone, 4 GFP-negative Neurone, 5 Pyramidenzellen und 5 GIN rekonstruiert und erlaubten den Vergleich der Zellgruppen zueinander.

### 5.1.3. Methoden der elektrophysiologischen Ableitungen

Des Weiteren wurden elektrophysiologische Ableitungen an GFP-positiven Neuronen der EPP vorgenommen, um deren passive und aktive Membraneigenschaften und deren Entladungsverhalten charakterisieren zu können. Dies geschah im Vergleich zu GIN, Pyramidenzellen und GFP-negativen Neuronen der gleichen Region.

Die elektrophysiologischen Ableitungen und darauf folgende Auswertungen erfolgten standardisiert gleich für alle Zellgruppen anhand derselben Untersuchungsprotokolle. Die erhaltenen Messergebnisse konnten aus diesem Grund gut über die verschiedenen Zellgruppen hinweg miteinander verglichen werden.

Da es sich dabei jedoch um ein invasives Verfahren handelt, könnten die durch direkte Interaktion mit der Zelle gemessenen Parameter beeinflusst werden. Als Beispiel seien die Intrazellulärlösung und die ACSF genannt. Je nach Zusammensetzung der Ionen und deren Konzentrationsverhältnis kann die Lösung z.B. das Ruhemembranpotenzial beeinflussen.

Insbesondere in Bezug auf das Entladungsverhalten ist hier zu erwähnen, dass sich dessen qualitative Untersuchung auf die Kontinuität der Entladung beschränkte. Alle Neuronen wurden in eine von drei Gruppen gegliedert [Riedemann et al., 2018]: dabei wurden in dieser Arbeit nur „*kontinuierlich feuernde*“ oder „*diskontinuierlich feuernde*“ Neurone beobachtet. „*Burst*“-artiges Verhalten konnte in beiden Gruppen nicht beobachtet werden.

Ursache dieser groben Gliederung ist die große Unklarheit darüber, wie anderweitig vielfach verwendete Begriffe wie „*adaptierendes*“, „*reguläres*“, „*irreguläres*“ oder „*stotterndes*“ Entladungsmuster genau definiert sind, da es keine quantitativen Kriterien gibt [Ascoli et al., 2008, Connors et al., 1990, Gupta et al., 2000, Kawaguchi et al., 1988]:

- Der Begriff Adaptation bezeichnet eine schnelle Reduktion der Maximalfrequenz eines feuernden Neurons auf eine niedrige Gleichgewichtsfrequenz bei anhaltender Strominjektion. Zur Klassifikation nach „*adaptierendem*“ oder „*nicht-adaptierendem*“ Verhalten existieren verschiedene, uneinheitliche Kriterien [Ascoli et al., 2008; DeFelipe et al., 2012].
- Gleiches gilt für die Begriffe „*regulär*“, „*irregulär*“ bzw. „*stotternd*“. Während „*reguläres*“ Verhalten ein Entladungsmuster meint, bei dem die einzelnen Interspike-

Intervalle normal verteilt sind, bezeichnet „*irreguläres*“ Verhalten ein solches, bei dem das nicht der Fall ist. „*Stotternde*“ Neurone sind ein Sonderfall dieses irregulären Entladungsmusters, bei dem sich Phasen hoher Aktivität mit langen Pausen abwechseln. Die Grenzen zwischen den Entladungsarten sind jedoch fließend und variieren deshalb stark. Erschwerend kommt hinzu, dass ein Neuron abhängig von der verwendeten Stromstärke unterschiedliche Entladungsmuster zeigen kann.

Dem Wert des Entladungsmusters zur Klassifizierung von Neuronen wurden deshalb bereits in anderen wissenschaftlichen Schriften Grenzen eingeräumt [McBain et al., 2001].

## 5.2. Die Lage der endopiriformen Population

Die EPP konnte anhand von Referenzaufnahmen [Franklin und Paxinos, 2012] dem Kerngebiet des Ncl. endopiriformis und möglicherweise auch des Claustrums zugeordnet werden (vgl. Abb. 4 und 5).

Gerade über die Funktion des Claustrum besteht bis heute immer noch viel Unklarheit. Bereits die anatomische Zuordnung des Kerngebiets ist schwierig und die Frage unbeantwortet, ob es corticalen Ursprungs ist oder den Basalganglien zugehört [Miyashita et al., 2005, Pirone et al., 2012]. Schon der Begriff „*Clastrum*“ wird unterschiedlich definiert und umfasst oft ein „*dorsales Claustrum*“ und ein „*ventrales Claustrum*“. Während das „*dorsale Claustrum*“ das eigentliche Claustrum (insuläres Claustrum) oder Area 8 nach Brodmann [1909] bezeichnet, ist mit „*ventralem Claustrum*“ der Nucleus endopiriformis gemeint. Dieser gliedert sich wiederum in einen ventralen und dorsalen Anteil [Mathur, 2014]. So werden zum einen Untersuchungen an beiden Strukturen und deren Auswertung und zum anderen die Interpretation der schon vorhandenen Daten erschwert. Zusätzlich variiert die Größe und Form des Claustrums je nach Spezies [Kowianski et al., 1999]. Besonders problematisch ist die Gliederung in Säugern, denen eine Capsula extrema als Abgrenzung zum darüber befindlichen insulären und piriformen Cortex fehlt [Mathur, 2014]. Dies ist auch bei der Maus der Fall [Watson et al., 2016].

Verschiedene Markerproteine, die während der Entwicklung und im adulten Stadium exprimiert werden, tragen zu einem besseren Verständnis der Anatomie bei. Es konnte gezeigt werden, dass der claustramygdaloide Komplex und der piriforme Cortex den Transkriptionsfaktor Tbr1 (engl.: T-box, brain, 1) exprimieren, der Regionen pallialen Ursprungs kennzeichnet. Durch das unterschiedliche Expressionsmuster von Dbx1 (engl.: developing brain homeobox protein 1), Ngn2 (Neurogenin2), Emx1, (engl.: empty spiracles homeobox 1), Cad8 (Cadherin 8) und Sema5A (Semaphorin 5A) konnten Teile, die dem ventralen Pallium entspringen (Dbx1, Ngn2, Sema5A) von solchen unterschieden werden, die dem lateralen Pallium entspringen (Emx1 und Cad8). Dadurch wurde gezeigt, dass das Claustrum proper zum lateralen Pallium zählt, der dorsale und ventrale Nucleus endopiriformis zum ventralen Pallium [Medina et al., 2004, Puelles et al., 2000]. Das Claustrum proper kann anhand der Cadherin-Expression wiederum in drei Teile gegliedert werden: einen superioren, einen intermediären und inferioren Bereich [Obst-Pernberg et al., 2001].

In der Maus kennzeichnet sich das Claustrum außerdem durch ein Netrin-Expression, das in der Zellmembran sitzt. Netrin-G2, aber nicht Netrin-G1 wurden innerhalb dieses Kerngebietes exprimiert [Watakabe et al., 2014, Yin et al., 2002]. Die Marker Cux2 (engl.: cut like homeobox 2) und Nurr1 (engl.: nuclear receptor related protein 1) zeigten nur im Claustrum und insulären Cortex eine Coexpression. Nurr1-positive Neurone waren VGluT1-positiv (vesikulärer Glutamat-Transporter 1) und bildeten eine Gruppe glutamaterger Pyramidenzellen mit corticaler Projektion [Watakabe et al., 2014]. Gleiches wurde im Claustrum des Affen bestätigt [Miyashita et al., 2005]. Die G-Protein  $\gamma$  2 Untereinheit (Gng2) wurde als Marker dieser Region in der Ratte identifiziert [Mathur et al., 2009] und schien vor allem in Gliazellen exprimiert zu werden [Pirone et al., 2012].

Neuere Untersuchungen gehen sogar davon aus, dass der dorsale Nucleus endopiriformis und das Claustrum beide dem lateralen Pallium entspringen (und werden somit als claustramygdaloide Komplex zusammengefasst), während der ventrale Nucleus endopiriformis Teil des ventralen Palliums ist [Smith et al., 2018, Watson et al., 2017].

Anhand der durchgeführten Referenzaufnahmen ließ sich die endopiriforme Population größtenteils dem dorsalen Nucleus endopiriformis zuordnen. Da die Grenzen vor allem nach dorsal unscharf abzugrenzen sind, ist es jedoch durchaus möglich, dass ein Teil der GFP-positiven Neurone tatsächlich im Claustrum lokalisiert ist. Weitere

Untersuchungen unter der Anwendung erwähnter Marker könnte die genaue Lokalisation der endopiriformen Population und den Ursprung dieser Zellen klären.

### **5.3. Verschaltung der endopiriformen Population**

Der Nucleus endopiriformis zeichnet sich durch starke intrinsische Verbindungen und extensive Vernetzung mit dem Vorderhirn aus. Man geht davon aus, dass dieses Kerngebiet deshalb an der Verarbeitung der Geruchswahrnehmung beteiligt ist [Behan et al., 1999, Lipowska et al., 2000, Luskin et al., 1983, Majak et al., 2002, Sugai et al., 2012]. Außerdem spricht man ihm eine Rolle bei der Entstehung von Epilepsien zu.

Das Claustrum zeigt viele Verbindungen mit anderen corticalen Bereichen. Bei Säugern mit gut entwickelter claustralen Struktur sind die anterioren Anteile vor allem mit dem Motor- und präfrontalen Cortex verbunden. Zentrale Anteile stehen mit dem sensomotorischen Cortex in Verbindung und die posterioren Bereiche sind vor allem mit dem visuellen Cortex vernetzt [LeVay et al., 1981, Macchi et al., 1983, Morys et al., 1996, Pearson et al., 1982]. Aufgrund seiner zahlreichen Verbindungen existieren viele Hypothesen hinsichtlich der Funktion des Claustrums [Baizer et al., 2014, Crick et al., 2005, Smith et al., 2012, Smythies et al., 2012, Smythies et al., 2014].

Da die genaue Funktion beider Kerngebiete immer noch nicht endgültig geklärt ist, könne durch die Anwendung von retrograden und anterograden Tracern die Verschaltung der EPP mit anderen Kern- und Rindengebieten untersucht werden. Anterograde Tracer wie Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L) können die Zielstrukturen der axonalen Projektion ausgehend vom Zellkern identifizieren [Deller et al., 2000]. Retrograde Tracer verfolgen den Axonverlauf ausgehend von der Synapse. Beispiel eines retrograden Tracers ist Hydroxystilbamidin (FluoroGold).

Dies erfolgte bereits im Claustrum der Maus [Wang et al., 2017] und der Ratte [Smith et al., 2018]. In beiden Studien fand man umfangreiche Verschaltungen des claustrum-endopiriformen Komplexes mit zahlreichen Rindengebieten.

## 5.4. Eigenschaften GFP-positiver Neurone in der endopiriformen Population

### 5.4.1. Neurochemisches Profil

#### 5.4.1.1. Somatostatin in der EPP

Für GIN wurde in allen bisherigen Untersuchungen eine SOM-Immunoreaktivität von über 90% nachgewiesen [Halabisky et al., 2006, Oliva et al., 2000, Riedemann et al., 2016, Xu et al., 2006].

Das Verteilungsmuster und neurochemische Profil der GIN im piriformen Cortex wurde bisher noch nicht überprüft. GABAerge Interneurone [Suzuki et al., 2007, Zhang et al., 2006] und das SOM-Expressionsmuster dieses Rindenareals und des Ncl. endopiriformis bzw. des Claustrums wurden aber bereits analysiert. Eiden et al. [1990] fanden keine Unterschiede zwischen der SOM-Expression des Claustrums und des darüber liegenden piriformen Cortex der Ratte. Die Verteilung SOM-exprimierender Zellen im Claustrum des Menschen und des Javaneraffen zeigte keine regionalen Unterschiede in der rostrocaudalen und dorsoventralen Achse [Pirone et al., 2014]. Gleiche Ergebnisse bezüglich der Verteilung SOM-exprimierender Zellen konnten bei Untersuchungen an der Ratte bestätigt werden [Kowianski et al., 2001]. Im Gegensatz dazu konnten im Claustrum des Schimpansen keine SOM-exprimierenden Neurone nachgewiesen werden [Pirone et al., 2014]. Die SOM-Expression des Nucleus endopiriformis schien sich in diesen Untersuchungen nicht von der des Claustrums abzusetzen.

Dieses Verteilungsmuster konnte auch in dieser Arbeit für das Neuropeptid SOM bestätigt werden. SOM-exprimierende Neurone fanden sich sowohl im piriformen Cortex als auch in der EPP. 53 % aller SOM-positiven Neurone verteilten sich in der EPP, 47 % im piriformen Cortex. In der Verteilung in der rostrocaudalen und dorsoventralen Achse konnten ebenfalls keine Unterschiede ermittelt werden und entsprach damit den vorhergegangenen Untersuchungen.

Hinsichtlich des Coexpressionsmusters von GFP und SOM wurden bereits viele unterschiedliche corticale Rindengebiete analysiert. Die beobachteten Werte für die Coexpression beliefen sich im Hippocampus auf über 95 % [Oliva et al., 2000], im somatosensorischen Cortex ebenfalls auf über 95 % [Ma et al., 2006] [Halabisky et



al., 2006] und im cingulären Cortex auf 98 % [Riedemann et al., 2016] aller GIN. In der EPP betrug die Coexpression dagegen nur 1-3%. Nur eine Minderheit aller GFP-positiven Neurone exprimierten also SOM, die übrigen 97-99 % zeigten sich negativ für den „Standardmarker“ der GIN.

#### 5.4.1.2. *Parvalbumin und GAD65/67 in der endopiriformen Population*

Da PV-positive Neurone mit knapp 40 % die größte Gruppe GABAerger Interneurone bilden [Rudy et al., 2011, Tamamaki et al., 2003, Xu et al., 2010], wurde die Coexpression der GFP-positiven Neurone der EPP mit diesem Marker untersucht. Obwohl PV- und SOM-positive Interneurone zwei unterschiedliche Subklassen GABAerger Interneurone bilden, wurde schon eine Coexpressionen beider Marker in demselben Neuron beschrieben [Nassar et al., 2015]. Außerdem entspringen beide Zellgruppen einer gemeinsamen Progenitorlinie aus der ganglionären Eminenz [Wonders et al., 2006].

Hu et al. [2013] beschrieb ein Phänomen, bei dem GFP-markierte Neurone einer Mauslinie, die eine Untergruppe SOM-exprimierender Interneurone bilden sollten, PV exprimierten. Diese Untersuchungen wurden an der Somatostatin-IRES-Cre Mauslinie (SOM-Cre) [Taniguchi et al., 2011] durchgeführt. Es fanden sich 6-10% falsch positiv markierte GFP-Neurone in allen untersuchten corticalen Arealen, die sich als PV-positiv anstatt SOM-positiv erwiesen [Hu et al., 2013].

Da in der EPP keine Expression von PV in GFP-positiven Neuronen nachgewiesen werden konnte, wurde mithilfe eines Markers für GAD65/67 überprüft, ob es sich bei diesen Neuronen überhaupt um GABAerge Interneurone handeln konnte. Erstaunlicherweise zeigte sich dabei, dass ein Großteil der Zellen negativ für GAD65/67 war. „Echte“ GIN (SOM- und GAD65/67-positiv) bildeten nur einen Bruchteil von 1-3% aller GFP-positiven Neurone.

Die niedrige PV-Expression könnte auch zur Klärung der Lokalisation beitragen. Bei Untersuchungen am Hasen fand sich eine niedrige PV-Expression im Nucleus endopiriformis, während sich im Claustrum eine deutlich höhere Immunreaktivität abzeichnete [Wojcik et al., 2004].

#### 5.4.1.3. *CaMKII $\alpha$ -Expression in der endopiriformen Population*

Der weitaus größte Teil der GFP-positiven Neurone der EPP zeigte eine CaMKII $\alpha$ -Coexpression.

Allerdings werden durch die CaMKII $\alpha$ -Färbung nicht alle glutamatergen Neurone erfasst [Benson et al., 1991]. Je nach Rindengebiet variiert die Anzahl glutamaterger Projektionsneurone, die durch diesen Marker gekennzeichnet wird, zwischen 50-70% [Jones et al., 1994, Ouimet et al., 1984, Wang et al., 2013]. In der EPP konnten 90% der GFP-positiv markierten Zellen als CaMKII $\alpha$ -positiv identifiziert werden. Aufgrund des komplementären Verteilungsmusters der CaMKII $\alpha$ -positiven Neurone zu GAD65/67-positiven Interneuronen [McDonald et al., 2002], war ein glutamaterger Charakter der GFP-positiven Neurone der EPP anzunehmen.

Außerdem entsprach das ermittelte Verhältnis von CaMKII $\alpha$ -positiven Neuronen zu GAD65/67-positiven Interneuronen (9:1) vorherigen Untersuchungen am claustrum-endopiriformen Komplex: Vorhergegangene Studien an verschiedenen Spezies zeigten, dass zumindest im Claustrum der Anteil GABAerger Interneurone 6-12% von allen in diesem Kerngebiet vorhandenen Neuronen ausmacht [Braak et al., 1982, Gomez-Urquijo et al., 2000, Kowianski et al., 2008].

Im neurochemischen Profil bildete die Gruppe der GFP-exprimierenden Neurone der EPP also mindestens drei unterschiedliche Gruppen.

- 1) Zum einen fanden sich dort durchaus „echte“ GIN (1-3%), die sich durch GAD65/67- und SOM-Coexpression auszeichneten und somit zu einer Untergruppe der SOM-exprimierenden Interneurone zählten (vgl. Tab. 6). Es fanden sich keine PV-exprimierenden Neurone unter den GFP-positiven Neuronen.
- 2) Bei der zweiten Gruppe GFP-positiver Neurone in der EPP (~ 90%) handelte es sich um glutamaterge Projektionsneurone, die den Pyramidenzellmarker CaMKII $\alpha$ -coexprimierten (vgl. Tab. 7). Diese Zellen zeigten so gut wie keine Coexpression mit GAD65/67 (< 0,5%).
- 3) Die dritte Gruppe bildeten diejenigen GFP-positiven Neurone in der EPP (6-8%), die weder für GAD65/67 noch für CaMKII $\alpha$  eine Immunreaktivität zeigten.

In weiteren Untersuchungen gilt es zu klären, inwiefern sich diese Neurone weiter klassifizieren lassen.

#### **5.4.2. Morphologisches Profil der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population**

Der cytoarchitektonische Aufbau des piriformen Cortex wurde in vorhergegangenen Untersuchungen bereits beschrieben [Kowianski et al., 1999, Tseng et al., 1989].

Im Claustrum der Katze wurden drei Zelltypen unterschieden [LeVay et al., 1981]: Zum einen handelt es sich dabei um große Zellen mit zahlreichen Dornfortsätzen, die auch am häufigsten zu finden waren. Teilweise verliefen die Dendriten dieser Zellen radiär in alle Richtungen. Bei einem anderen Teil dieser Gruppe ähnelte der Dendritenbaum mehr Pyramidenzellen. Axone dieser Neurone verliefen meist in dorsomediale Richtung und konnten teilweise bis in die weiße Substanz verfolgt werden. Diese Zellgruppe wurde auch bei Mamos et al. [1986] gefunden. Bei dem zweiten Zelltyp handelte es sich um kleine Zellen, die keine Dornfortsätze aufwiesen. Das Axon dieser Zellen verzweigte regional stark. Diese Zellgruppe lag vorwiegend in Randbereichen des Claustrums. Eine dritte Zellgruppe mit ebenfalls kleinen Somata wies ausgedehnte, aber kaum verzweigte Dendriten ohne Dornfortsätze auf. Die Axone konnten nicht nachverfolgt werden [LeVay et al., 1981].

Hinsichtlich ihrer Morphologie entsprachen die GFP-positiven Neurone nicht der gängigen Klassifikation der SOM-positiven GIN, die größtenteils zur Gruppe der Martinotti-Zellen gezählt werden können. Ein Großteil der rekonstruierten Zellen (16 von 19) zeigte eine pyramidale Morphologie mit einem Hauptdendriten und mehreren kleinen basalen Dendriten. Deutlich zu erkennen war das reichhaltige Vorkommen von dendritischen Dornfortsätzen. Das Axon verließ den Zellkern in entgegengesetzter Richtung zum Hauptdendriten und bildete nicht wie bei den GIN ein regional dichtes Axongeflecht, sondern konnte zum Teil über längere Strecken verfolgt werden. Dies entspricht vorherigen Untersuchungen der Zellmorphologie des Claustrums [Crick et al., 2005, Watakabe et al., 2014], vielleicht auch des claustrum-endopiriformen Komplexes [Smith et al., 2018].

Da die axonalen Fortsätze jedoch gelegentlich auch die Schnittebene verließen, stellte sich deren Rekonstruktion als eine besondere Herausforderung dar. Insbesondere traf dies auch auf die Pyramidenzellen und GFP-negativen Neurone zu. Dennoch zeigten sich auch eindeutige Unterschiede zu Pyramidenzellen aus den corticalen Rindenschichten: während der Hauptdendrit dieser Pyramidenzellen eine senkrechte

Orientierung zur Piaoberfläche aufwies, erschien die Orientierung der GFP-positiven und GFP-negativen Zellen des claustrum-endopiriformen Komplexes eher ventromedial oder -lateral. Die schräge Ausrichtung des Hauptdendriten scheint ein typisches Merkmal claustraler Neurone zu sein [Watakabe et al., 2014].

Da es sich bei den GFP-positiven Neuronen insgesamt um kleine Zellen handelt, zeigten sich hier ebenso Unterschiede zu corticalen Pyramidenzellen bezüglich der dendritischen Gesamtlänge, Gesamtfläche und Verzweigungspunkte. Gegenüber den corticalen GIN fanden sich Unterschiede im maximalen Verzweigungsgrad der dendritischen Fortsätze und vor allem in der gesamten Axonlänge. Untersuchte GFP-positive und GFP-negative Neurone in der EPP unterschieden sich untereinander nicht. Beide Zellgruppen zeigten einen vorwiegend pyramidalen Phänotyp, wiesen aber sowohl Unterschiede zur Gruppe der Pyramidenzellen als auch zur Gruppe der GIN auf.

Im piriformen Cortex der Maus konnten anhand morphometrischer und elektrophysiologischer Messungen zwei unterschiedliche Hauptzelltypen gefunden werden, sog. „*semilunar cells*“ und „*superficial pyramidal cells*“ (Suzuki and Bekkers, 2012). Vergleicht man die elektrophysiologischen und morphologischen Messdaten der vorliegenden Arbeit mit denen von Suzuki und Bekkers (2012), ähneln die GFP-positiven Zellen der EPP den sog. SP-Zellen.

### **5.4.3. Elektrophysiologische Eigenschaften der GFP-positiven Neurone der endopiriformen Population**

#### **5.4.3.1. Passive Membraneigenschaften**

Die Untersuchung der passiven Membraneigenschaften der GFP-positiven Neurone zeigte (vgl. Abb. 20), dass die Zellen der EPP sich hinsichtlich ihres Ruhemembranpotenzials signifikant von corticalen GIN unterschieden. Bezüglich der Membrankapazität zeigten die GFP-positiven Neurone der EPP signifikante Unterschiede zu Pyramidenzellen. Auch hier zeigten sich interessanterweise keine signifikanten Unterschiede der GFP-positiven und GFP-negativen Neuronen der EPP zueinander. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei GFP-positiven und GFP-negativen

Neurone der EPP um die eine ähnliche Zellgruppe handeln könnte, wobei dies durch weitere Experimente zu untersuchen wäre.

#### 5.4.3.2. *Beurteilung der Strom-Spannungs-Beziehung*

In der Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung zeigte sich, dass diese nahe dem Ruhemembranpotenzial relativ linear verliefen, in hyperpolarisierender und depolarisierender Richtung fanden sich jedoch Abweichungen von dieser linearen Beziehung (Abb. 21.1–21.3 B und C). Diese Eigenschaft von Neuronen, nämlich die Abhängigkeit des Membranwiderstandes vom Membranpotenzial, wird auch als gleichrichtendes Verhalten oder Rektifikation bezeichnet. Mit zunehmender Hyperpolarisation kam es wie von Connors et al. [1982] beschrieben zu einer Abnahme dieses Widerstandes (hyperpolarisierende Einwärtsgleichrichtung). Bei Depolarisation hingegen nahm der Widerstand zu [Sutor et al., 1987]. Dies bezeichnet man als depolarisierende Einwärtsgleichrichtung. Ursache dafür sind verschiedene unterschwellige Membranleitfähigkeiten, die sowohl in hyperpolarisierender als auch in depolarisierender Richtung auftreten. Anhand des Rektifikationskoeffizienten konnten alle Zellen als Einwärtsgleichrichter identifiziert werden (vgl. Abb. 21.1-21.3).

Die Strom-Spannungs-Beziehung von GFP-positiven Neuronen der EPP unterschied sich deutlich von GIN. GFP-positive Neurone zeigten nicht das „*Sag-Potenzial*“, das für GIN typisch ist [Riedemann et al., 2018], dafür aber eine deutlich ausgeprägtere Einwärtsgleichrichtung.

#### 5.4.3.3. *Analyse der Eigenschaften des Aktionspotenzials und der Entladung*

Diese Tatsache fand sich auch in der Auswertung der Aktionspotenziale wieder: Das einzelne Aktionspotenzial der GIN unterschied sich deutlich von den anderen drei Zellgruppen (vgl. Abb. 24). Insgesamt unterschieden sich GIN deutlich in einem Großteil ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften von den GFP-positiven Neuronen.

Bei der Auswertung der Elektrophysiologie zeigte sich allerdings auch, dass durchaus noch Raum für eine genauere Klassifizierung der GFP-positiven und auch der GFP-negativen Neurone in der EPP besteht. Häufig zeigten sich in der Analyse nicht normverteilte Daten, z.B. bei der Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial oder bei der maximalen Entladungsfrequenz. Hier ließen sich deutlich mindestens zwei verschiedene Untergruppen in beiden Gruppen ausmachen (vgl. Abb 27).

## **5.5. Betrachtung der GFP-Expression in der endopiriformen Population**

Die GFP-Expression in der GIN-Maus wurde in allen bisher untersuchten Cortexarealen als Marker für eine Untergruppe der SOM-positiven Interneurone verwendet. Diese Zellgruppe umfasst eine sehr heterogene Gruppe an SOM-positiven Neuronen, die sich dennoch alle als GABAerg präsentieren. Im Gegensatz dazu exprimierten die in dieser Arbeit beschriebene GFP-positive Zellgruppe sowohl SOM als auch GAD65/67 nur in sehr geringem Umfang. Da die GFP-Expression in der EPP aber räumlich strukturiert auftritt und in vielen Tieren über viele Generationen nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich dabei nicht um eine zufällige, diffuse Expression des GFP-Gens handelt. Die unspezifische Markierung von Neuronen mit GFP wäre sonst bereits in anderen corticalen Strukturen aufgefallen.

### **5.5.1. Stochastische Modelle zur Erfassung der Genaktivität**

Allgemein ist zu berücksichtigen, dass Gene nicht kontinuierlich aktiv sind. In einer Zelle wird nicht zu jedem Zeitpunkt die gleiche RNA-Menge transkribiert. Vielmehr wechseln irreguläre, kurze Phasen mit hoher Transkriptionsrate eines Gens mit irregulären Intervallen der Inaktivität [Raj et al., 2006].

Stochastische Verfahren versuchen diese Transkriptionskinetik zu erfassen und die Wahrscheinlichkeit der Expression eines bestimmten Gens zu berechnen. Das „one-state“ Modell (engl.: „nur ein Zustand“) beschreibt einen Zustand, bei dem die Transkription in Abhängigkeit einer konstant gleichen Wahrscheinlichkeit geschieht. Sie

bedingt bei stark und moderat exprimierten Genen eine geringe Varianz der Expression in der transkribierten RNA-Menge [Corrigan et al., 2016]. Dieses Modell kann für manche stark exprimierten Gene verwendet werden. Die RNA-Verteilung pro Zelle entspricht dann innerhalb eines Zellverbundes einer Poisson-Verteilung.

Dies ist jedoch meistens nicht der Fall. Deshalb wurden weitere Modelle zur Annäherung an andere Transkriptionsmodi entwickelt. Dazu zählt das „*two-state*“ Modell. Es beschreibt einen Klassenwechsel zwischen aktivem Zustand mit einer Genexpression, die dann mit einer konstanten Wahrscheinlichkeit erfolgt, und Phasen der Inaktivität, in der das Gen nicht transkribiert wird [Corrigan et al., 2016].

Bereits in den 50er Jahren wurde gezeigt, dass die Synthese einer  $\beta$ -Galaktosidase in verschiedenen Zellen auf sehr variable und zufällige Art und Weise geschieht. Durch Induktion konnte der Anteil der Zellen, die das Enzym exprimieren, erhöht werden. Das Expressionsniveau wurde dabei in allen Zellen um das gleiche Maß erhöht [Novick et al., 1957]. Ko et al. [1990] beschrieben dasselbe Phänomen der Induktion. Die genannten und vereinfachenden Modelle erklären die Varianz der Expression eines bestimmten Gens innerhalb einer Zellgruppe. Wie es aber zu einer ektopen Genexpression in der Zellgruppe der GFP-positiven Neurone in der EPP kommen konnte, wird dadurch nicht erklärt.

### 5.5.2. GFP-Expression in der GIN Maus

Tatsächlich muss zur Transkription und Translation des GFP-Gens die Promotorregion des Gad1-Gens aktiviert werden. Möglicherweise greifen lokale Transkriptionsfaktoren, die nur in dieser Zellgruppe aktiv sind, in diesen Prozess ein, entweder durch Interaktion mit der Gad1-Promotorregion oder in direktem Zusammenspiel mit dem GFP-Strukturgen, und ermöglichen dadurch das Ablesen dieses Gens. Zur Bestätigung dieser Hypothese wären Genomanalysen erforderlich, um zu überprüfen, wie und wo das Transgen exprimiert wurde. Wie viele Kopien des Gens überhaupt in dem Genom der GIN-Maus integriert wurden und welche möglichen Transkriptionsfaktoren zur Induktion der Genexpression in diesem Zelltyp führen konnten, muss dabei ebenfalls berücksichtigt werden. Außerdem könnte das GFP-Expressionsmuster im Zusammenhang mit verschiedenen Faktoren überprüft wer-

den, um eine Aussage darüber zu erhalten, welche Promotoren oder auch Repressoren die Genexpression beeinflussen.

### 5.5.3. Mögliche Ursachen der GFP-Expression in der endopiriformen Population

Ein sog. „*Off-target labeling*“ SOM-positiver Interneurone wurde in der SOM-IRES-Cre Mauslinie [Taniguchi et al., 2011] beschrieben [Hu et al., 2013]. Dabei handelt es sich um eine Knock-In-Tierlinie, in der GFP in einer Gruppe SOM-exprimierender Interneurone in über 92% der Fälle nachgewiesen werden konnte. Bei 6-10% dieser Neurone stellte sich heraus, dass es sich dabei nicht wie erwartet um SOM-, sondern vielmehr um PV-exprimierende Interneurone handelt. Weitere 6-8% aller untersuchten Zellen exprimierten weder SOM noch PV [Hu et al., 2013].

Zu den möglichen Ursachen einer GFP-Expression wurden in dieser Arbeit zum einen genannt, dass SOM- und PV-exprimierende Neurone von denselben Progenitorzellen abstammen und zu irgendeinem Zeitpunkt in ihrer Entwicklung SOM und deswegen auch GFP exprimieren. Im Laufe der weiteren Zelldifferenzierung kommt zu einem „*Typwechsel*“ von SOM- zu PV-positiven Neuronen, die trotzdem weiterhin GFP exprimieren.

Da in der GIN-Maus die GFP-Expression an den Promotor des Gad1-Gens gekoppelt ist, ist es außerdem möglich, dass der Promotor in dieser Zellgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelldifferenzierung aktiv wurde. Allerdings handelt es sich bei Pyramidenzellen und GABAergen Interneuronen um grundlegend verschiedene Neuronenklassen, die im Gegensatz zu PV- und SOM-exprimierenden Neuronen verschiedenen Ursprungs sind und nicht von der gleichen Progenitorlinie abstammen. Inwieweit ein „*Switch*“ von Interneuron- zu Pyramidenzelltyp möglich ist und ob dieses Phänomen für die Entstehung der GFP-positive Neuronenpopulation verantwortlich ist, ist unklar und gilt es zu klären.

Interessanterweise konnten im piriformen Cortex der Maus unreife, doublecortin-exprimierende Neurone nachgewiesen werden [Cai et al., 2009, Klempin et al., 2011, Rotheneichner et al., 2018, Rubio et al., 2016]. Diese Zellen werden zwar pränatal geboren, verbleiben allerdings in einem eher unreifen Zustand im piriformen Cortex der Maus erhalten. Sie sind sogar in der Lage, sich in den lokalen Schaltkreis zu in-



tegrieren [Rotheneichner et al., 2018]. Diese Zellen scheinen nicht zu GABAergen Interneuronen, sondern zu CaMKII $\alpha$ -positiven Neuronen auszureifen, deren Morphologie dann den GFP-exprimierenden Neuronen der EPP ähnelt. Es bleibt also zu untersuchen, ob es sich bei den GFP-positiven Neuronen der EPP möglicherweise um eine Anhäufung unreifer oder ausgereifter exzitatorischer Neurone handelt, die in die lokalen Schaltkreise integriert sind oder werden, oder um reife Projektionsneurone.

Ein anderer Ansatzpunkt nach Hu et al. [2013] war, dass sowohl das PV- als auch SOM-Gen transkribiert wurde, aber nur das PV-Transkript translatiert wurde. Alternativ wäre auch die Transkription und Translation beider Genprodukte denkbar, allerdings für SOM in so geringem Umfang, dass es immunhistochemisch nicht nachweisbar war. Bei Übertragung dieser Überlegung auf die GFP-exprimierenden Neurone der Population würde dies bedeuten, dass sowohl das GFP als auch das GAD67-Gen (Zielgen des GAD1-Promotors) transkribiert werden, aber nur GFP translatiert, oder beide Gene transkribiert und translatiert werden, GAD67 aber in nicht nachweisbarer Menge. Tatsächlich ist die Darstellung GAD65/67-positiver Neurone in immunhistochemischen Untersuchungen teilweise schwierig, da das Neuropil ebenfalls stark gefärbt wird. Bemerkenswert wäre in beiden Szenarien die fehlende Coexpression von SOM in den GFP-positiven Neuronen, die GIN in corticalen Rindenschichten auszeichnen. Noch dazu waren die GFP-positiven Neurone der EPP CaMKII $\alpha$ -positiv, schienen also eine sehr unterschiedliche Zellgruppe mit glutamatergen Charakter im Vergleich zu den GIN zu bilden.

Mögliche Ursachen einer ektopen GFP-Expression sind also:

- Aktivität des Gad1-Promotors zu irgendeinem Zeitpunkt der Zellentwicklung mit persistierender GFP-Expression.
  - Zum Beispiel wäre denkbar, dass GFP-positive Neurone eine unreife Neuronenpopulation bilden, die zu verschiedenen Zelltypen ausreifen kann.
- Transkription des Gad1-Genprodukts (GAD67) und des GFP-Gens, wobei nur das GFP-Produkt translatiert wird.
- Translation beider Genprodukte; GAD67 in so geringer Menge, dass kein Nachweis mittels Immunhistochemie möglich war.

- Interaktion von Transkriptionsfaktoren oder anderen Genprodukten mit dem Gad1-Promotor oder direkt mit dem GFP-Gen, die nur in diesem Zelltyp stattfindet und deswegen nur in diesem Zelltyp zu einer GFP-Expression führt.
- „*unscharfe*“ Transkription oder Translation, die dafür sorgt, das GFP sozusagen als „*Nebenprodukt*“ exprimiert wird.

## 6.Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer falsch positiven GFP-Markierung in der GIN-Maus der Nucleus endopiriformis und teilweise auch das Claustrum abgegrenzt werden konnten. Diese GFP-positiven Neurone unterschieden sich von bisher untersuchten GIN-Neuronen anderer corticaler Gebiete, wiesen aber elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften auf, die in Einklang mit bisherigen Untersuchungen am claustrum-endopiriformen Komplex stehen. Somit könnte die GIN-Maus in Zukunft auch für gezielte Untersuchungen an diesen Strukturen genutzt werden, da sich die anatomische Abgrenzung beider Kerngebiete insgesamt als schwierig gestaltet.

Des weiteren bleibt umformuliert das festzuhalten, was Hu et al. [2013] in seinem wissenschaftlichen Artikel bereits als Überschrift verwendete: „*Es ist nicht alles GIN, was GFP-positiv ist.*“ Das bedeutet für weitere Untersuchungen an transgenen Tierlinien oder Knock-In-/Knock-Out-Modellen, dass die Eigenschaften der untersuchten Zellgruppe vor den eigentlichen Experimenten immer überprüft werden müssen, da es aus verschiedensten Gründen zu einer falschen Markierung von Neuronen kommen kann. Der genaue Mechanismus der Insertion eines rekombinanten Genprodukts in das Genom ist oft nicht vollständig nachzuvollziehen. Welche Promotoren in welchen Zellgruppen aktiv sind, wie sie mit den Genprodukten interagieren und wie die Insertion eines rekombinanten Gens die Zellfunktion beeinflusst, ist ein äußerst komplexes Zusammenspiel. Die weitere Erforschung dieser Zusammenhänge ist von immenser Bedeutung für die Weiterentwicklung der Gentechnologie.

## 7. Abbildungsverzeichnis

<u>Nummerierung:</u>	<u>Titel (ohne Text in Klammern)</u>
Abbildung 1	Darstellung einer corticalen Pyramidenzelle
Abbildung 2	Schematische Darstellung verschiedener Interneuronklassen
Abbildung 3	Darstellung einer GIN aus dem Hippocampus der Maus
Abbildung 4	Anatomische Zuordnung der lateralen pallialen Population anhand koronaler Schnittpräparate
Abbildung 5	Anatomische Zuordnung der lateralen pallialen Population anhand sagittaler und horizontaler Schnittführung
Abbildung 6	Übersichtsaufnahme der lateralen pallialen Population
Abbildung 7	Darstellung der lateralen pallialen Population mit dem verwendeten Raster für immunhistochemische Zählungen
Abbildung 8	Darstellung der Verteilung von GFP und SOM in den Sektoren I, II und III sowie die Coexpression beider Marker bezogen auf die Gesamtmenge aller GFP-positiven Neuronen und aller SOM-positiven Neuronen
Abbildung 9	Darstellung der Coexpression von GFP, PV und DAPI in der lateralen pallialen Population bei 40-facher Vergrößerung
Abbildung 10	Darstellung der Coexpression von GFP, SOM, GAD65/67 und DAPI in der lateralen pallialen Population bei 40-facher Vergrößerung
Abbildung 11	Darstellung der Coexpression von GFP, SOM, GAD65/67 und DAPI im piriformen Cortex bei 40-facher Vergrößerung
Abbildung 12	Darstellung der Coexpression von GFP, CaMKII, GAD65/67 und DAPI in der lateralen pallialen Population bei 40-facher Vergrößerung
Abbildung 13	Darstellung der Coexpression von GFP, CaMKII, GAD65/67 und DAPI im piriformen Cortex bei 40-facher Vergrößerung
Abbildung 14	Darstellung einer Pyramidenzelle in Nah- und Übersichtsaufnahme und deren Polaritätshistogramm
Abbildung 15	Darstellung eines GIN in Nah- und Übersichtsaufnahme und dessen Polaritätshistogramm
Abbildung 16	Darstellung eines GFP-positiven Neurons in Nah- und Übersichtsaufnahme und dessen Polaritätshistogramm
Abbildung 17	Darstellung eines GFP-negativen Neurons in Nah- und Übersichtsaufnahme und dessen Polaritätshistogramm
Abbildung 18	Sholl-Analyse der dendritischen und axonalen Fortsätze
Abbildung 19	Identifikation von Neuronen für elektrophysiologische Untersuchungen
Abbildung 20	Passive Eigenschaften GFP-positiver Neurone der lateralen pallialen Population im Vergleich zu GFP-negativen Neuronen, GIN und Pyramidenzellen

Abbildung 21.1	Strom-Spannungs-Beziehung von zwei GFP-positiven Neuronen der lateralen pallialen Population
Abbildung 21.2	Strom-Spannungs-Beziehung von zwei GFP-negativen Neuronen der lateralen pallialen Population
Abbildung 21.3	Strom-Spannungs-Beziehung eines GIN und einer Pyramidenzelle der corticalen Rindenschicht
Abbildung 22	Darstellung des Steigungswiderstandes, des Rektifikationsindex im Gleichgewichtszustand, der Sag-Amplitude und der Latenz bis zur maximalen negativen Spannungsantwort im Gruppenvergleich
Abbildung 23	Darstellung des einzelnen Aktionspotenzials sowie dessen erste Ableitung eines GFP-positiven Neurons
Abbildung 24	Die Eigenschaften des einzelnen Aktionspotenzials der GFP-positiven Neurone, der GFP-negativen Neuronen der Pyramidenzellen und der GIN
Abbildung 25	Vergleich der Eigenschaften des ersten Aktionspotenzials von GFP-positiven Neuronen, negativen Neuronen und Pyramidenzellen zum ersten Aktionspotenzial der GIN bei halbmaximaler Stromstärke
Abbildung 26.1	Darstellung des Entladungsverhaltens zwei ausgewählter GFP-positiver Neurone der lateralen pallialen Population im Vergleich zu einem GIN
Abbildung 26.2	Darstellung des Entladungsverhaltens zwei ausgewählter GFP-negativer Neurone der lateralen pallialen Population im Vergleich zu einer Pyramidenzelle
Abbildung 27	Darstellung der Latenz bis zum ersten Aktionspotenzial und der Maximalfrequenz
Abbildung 28	Darstellung des Quotienten verschiedener Interspike Intervalle im Gruppenvergleich

## 8. Tabellenverzeichnis

<u>Nummerierung:</u>	<u>Titel (Ohne Text in Klammern):</u>
Tabelle 1	Verwendete Primärantikörper sowie deren Antigene, Herstellung und Katalognummer
Tabelle 2	Verwendete Sekundärantikörper sowie deren Wirt, Herstellung und Katalognummer
Tabelle 3	Zusammensetzung der ACSF
Tabelle 4	Zusammensetzung der Schneidelösung
Tabelle 5	Zusammensetzung der ICF
Tabelle 6	Coexpressionsmuster von GAD65/67 in GFP-positiven Neuronen, von SOM in GFP-positiven Neuronen und GAD65/67 in SOM-positiven Neuronen
Tabelle 7	Coexpressionsmuster von CaMKII $\alpha$ in GFP-positiven Neuronen, von GFP in CaMKII $\alpha$ -positiven Neuronen und von GAD in CaMKII $\alpha$ -positiven Neuronen
Tabelle 8	Darstellung der ermittelten morphometrischen Werte mit SD in den vier Zellgruppen
Tabelle 9	Kontinuität des Entladungsverhaltens der vier Zellgruppen

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ACSF	engl.: <i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AMPA	engl.: <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid receptor</i>
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
CA1-4 (Hippocampus)	Cornu Ammonis 1-4
CaMKII	Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II
Cre	engl.: <i>causes recombination</i>
Cy3	Cyanine 3
Cux2	engl.: <i>cut like homeobox 2</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dbx1	engl.: <i>developing brain homeobox protein 1</i>
DIC	Differenzial-Interferenzkontrast
DNS	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N N',N'-tetraessigsäure
EMX1	engl.: <i>empty spiracles homeobox protein 1</i>
EPSP	erregendes postsynaptisches Potenzial
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFP	green fluorescent protein
GIN	homozygote Mauslinie für FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J
Gng2	G-Protein gamma 2
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethnsulfonsäure
ICF	engl.: <i>intracellular fluid</i>
Ig	Immunglobulin
ISI	Interspike Intervall
Kainat	Kainsäure-Rezeptor
Lox	engl.: <i>locus of crossover</i>
LPP	laterale palliale Population
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
Ncl.	Nucleus
NeuN	engl.: <i>neuronal nuclei</i>
Ng2	Neurogenin 2
NGS	engl.: <i>normal goat serum</i>
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
Nurr1	engl.: <i>nuclear receptor related protein 1</i>
PB	engl.: <i>phosphate buffer</i>
PBS-T	engl.: <i>phosphate buffer</i> mit Triton
PC	piriformer Cortex
PFA	Paraformaldehyd
PHA-L	Phytohemagglutinin-L
PV	Parvalbumin
RMP	Ruhemembranpotenzial

Rn	Membraneingangswiderstand
SCID	engl.: <i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Sema5A	Semaphorin 5A
SOM	Somatostatin
$\tau$	somatische Membranzeitkonstante
Tbr1	engl.: <i>T-box, brain, 1</i>
VGLUT1	engl.: <i>vesicular glutamate transporter 1</i>
ZNS	Zentralnervensystem



## 10. Danksagung

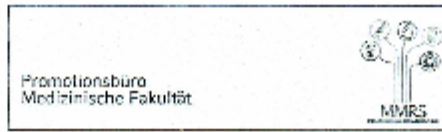
„Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens.“  
Jean-Baptiste Massillon

Herrn Prof. Dr. Bernd Sutor als meinem Betreuer und Doktorvater gilt mein herzlichster Dank. Sie haben mich geduldig in die unterschiedlichen Untersuchungstechniken und die Methoden der Datenauswertung eingewiesen und jederzeit vielseitiges und konstruktives Feedback angeboten. Vielen Dank für Ihre Unterstützung und die Bereitstellung des Dissertationsthemas.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. Magdalena Götz für die Aufnahme in das Department of Physiological Genomics und allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der LMU München, die mich unterstützt haben. Hier möchte ich besonders Frau Gabi Horn für die Vorbereitung der Versuchslösungen und Hirnschnitte und Herrn Franz Ruckerl für die geduldige Beantwortung von IT-Fragen hervorheben.

Ein besonders herzlicher Dank geht außerdem an meine lieben Freunde und meine liebe Familie, die mich immer begleiten und unterstützen. Vor allem möchte ich meine wunderbare Schwester hervorheben, die ein unglaubliches Verständnis für meine Fragen, Nöte und Probleme hatte und mir immer wieder geduldig mit einem offenen Ohr zugehört hat.

# 11. Eidesstaatliche Versicherung



**Riedemann, Maria-Sophie**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Gad1-Promotor abhängige Expression des grün-fluoreszierenden Proteins in nicht GABAergen Neuronen des claustrum-endopiriformen Komplexes einer transgenen Mauslinie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 30.11.2020**

Ort, Datum

**Maria-Sophie Riedemann**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## 12. Literaturverzeichnis

- Ablain, J., Zon, L.I. Tissue-specific gene targeting using CRISPR/Cas9. *Methods in cell biology*. 135 (2016) 189-202
- Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E.P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvarday, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., Munoz, A., Packer, A., Petersen, C.C., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C., Yuste, R. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Review Neuroscience*. 9 (2008) 557-568
- Baizer, J.S., Sherwood, C.C., Noonan, M., Hof, P.R. Comparative organization of the claustrum: what does structure tell us about function? *Frontiers in System Neuroscience*. 8 (2014) 117
- Bean, B.P. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Review Neuroscience*. 8 (2007) 451-465
- Behan, M., Haberly, L.B. Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *The Journal of comparative neurology*. 408 (1999) 532-548
- Bennett, M.K., Erondy, N.E., Kennedy, M.B. Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *Journal of Biological Chemistry*. 258 (1983) 12735-12744
- Benson, D.L., Isackson, P.J., Hendry, S.H., Jones, E.G. Differential gene expression for glutamic acid decarboxylase and type II calcium-calmodulin-dependent protein kinase in basal ganglia, thalamus, and hypothalamus of the monkey. *The Journal of Neuroscience*. 11 (1991) 1540-1564
- Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 301 (1983) 527-530
- Braak, H., Braak, E. Neuronal types in the claustrum of man. *Anatomy and embryology*. 163 (1982) 447-460
- Branda, C.S., Dymecki, S.M. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Developmental cell*. 6 (2004) 7-28
- Bu, D.F., Tobin, A.J. The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD. *Genomics*. 21 (1994) 222-228
- Buhl, E.H., Halasy, K., Somogyi, P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature*. 368 (1994) 823-828
- Cai, Y., Xiong, K., Chu, Y., Luo, D.W., Luo, X.G., Yuan, X.Y., Struble, R.G., Clough, R.W., Spencer, D.D., Williamson, A., Kordower, J.H., Patrylo, P.R., Yan, X.X.

Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups. *Experimental neurology*. 216 (2009) 342-356

Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., Helling, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 70 (1973) 3240-3244

Connors, B.W., Gutnick, M.J. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends in Neuroscience*. 13 (1990) 99-104

Connors, B.W., Gutnick, M.J., Prince, D.A. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*. 48 (1982) 1302-1320

Corrigan, A.M., Tunnacliffe, E., Cannon, D., Chubb, J.R. A continuum model of transcriptional bursting. *eLife*. 5 (2016)

Crick, F.C., Koch, C. What is the function of the claustrum? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 360 (2005) 1271-1279

DeFelipe, J., Farinas, I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*. 39 (1992) 563-607

DeFelipe, J., Lopez-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larranaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T.F., Gonzalez-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P.R., Huang, J., Jones, E.G., Kawaguchi, Y., Kisvarday, Z., Kubota, Y., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., McBain, C.J., Meyer, H.S., Monyer, H., Nelson, S.B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J.L., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G.M., Sherwood, C.C., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., Ascoli, G.A. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature reviews. Neuroscience*. 14 (2013) 202-216

Deller, T., Naumann, T., Frotscher, M. Retrograde and anterograde tracing combined with transmitter identification and electron microscopy. *Journal of neuroscience methods*. 103 (2000) 117-126

Denter, D.G., Heck, N., Riedemann, T., White, R., Kilb, W., Luhmann, H.J. GABAC receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex. *Neuroscience*. 167 (2010) 124-134

Dotdt, H.U., Zieglansberger, W. Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. *Brain research*. 537 (1990) 333-336

Doyle, A., McGarry, M.P., Lee, N.A., Lee, J.J. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic research*. 21 (2012) 327-349

Eiden, L.E., Mezey, E., Eskay, R.L., Beinfeld, M.C., Palkovits, M. Neuropeptide content and connectivity of the rat claustrum. *Brain research*. 523 (1990) 245-250

Emson, P.C., Lindvall, O. Distribution of putative neurotransmitters in the neocortex. *Neuroscience*. 4 (1979) 1-30

- Erondü, N.E., Kennedy, M.B. Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *The Journal of Neuroscience*. 5 (1985) 3270-3277
- Feldmeyer, D., Qi, G., Emmenegger, V., Staiger, J.F. Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Neuroscience*. 368 (2018) 132-151
- Freund, T.F., Buzsáki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6 (1996) 347-470
- Golgi, C. On the structure of nerve cells. 1898. *Journal of microscopy*. 155 (1989) 3-7
- Gomez-Urquijo, S.M., Gutierrez-Ibarluzea, I., Bueno-Lopez, J.L., Reblet, C. Percentage incidence of gamma-aminobutyric acid neurons in the claustrum of the rabbit and comparison with the cortex and putamen. *Neuroscience letters*. 282 (2000) 177-180
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77 (1980) 7380-7384
- Gupta, A., Wang, Y., Markram, H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science (New York, N.Y.)*. 287 (2000) 273-278
- Halabisky, B., Shen, F., Huguenard, J.R., Prince, D.A. Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *Journal of Neurophysiology*. 96 (2006) 834-845
- Harris, K.D., Mrsic-Flogel, T.D. Cortical connectivity and sensory coding. *Nature*. 503 (2013) 51-58
- Horikawa, K., Armstrong, W.E. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *Journal of neuroscience methods*. 25 (1988) 1-11
- Howe, J.R., Sutor, B., Zieglgansberger, W. Characteristics of long-duration inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical neurons in vitro. *Cellular and molecular neurobiology*. 7 (1987) 1-18
- Hu, H., Cavendish, J.Z., Agmon, A. Not all that glitters is gold: off-target recombination in the somatostatin-IRES-Cre mouse line labels a subset of fast-spiking interneurons. *Frontiers in neural circuits*. 7 (2013) 195
- Jones, E.G., Huntley, G.W., Benson, D.L. Alpha calcium/calmodulin-dependent protein kinase II selectively expressed in a subpopulation of excitatory neurons in monkey sensory-motor cortex: comparison with GAD-67 expression. *The Journal of Neuroscience*. 14 (1994) 611-629
- Kawaguchi, Y., Hama, K. Physiological heterogeneity of nonpyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. *Experimental brain research*. 72 (1988) 494-502

Kawaguchi, Y., Kondo, S. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *Journal of neurocytology*. 31 (2002) 277-287

Kay, R.B., Brunjes, P.C. Diversity among principal and GABAergic neurons of the anterior olfactory nucleus. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8 (2014) 111

Keller, C.J., Honey, C.J., Megevand, P., Entz, L., Ulbert, I., Mehta, A.D. Mapping human brain networks with cortico-cortical evoked potentials. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 369 (2014)

Klempin, F., Kronenberg, G., Cheung, G., Kettenmann, H., Kempermann, G. Properties of doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PloS one*. 6 (2011) e25760

Ko, M.S., Nakauchi, H., Takahashi, N. The dose dependence of glucocorticoid-inducible gene expression results from changes in the number of transcriptionally active templates. *The EMBO journal*. 9 (1990) 2835-2842

Kowianski, P., Dziwiatkowski, J., Kowianska, J., Morys, J. Comparative anatomy of the claustrum in selected species: A morphometric analysis. *Brain, behavior and evolution*. 53 (1999) 44-54

Kowianski, P., Morys, J.M., Dziwiatkowski, J., Wojcik, S., Sidor-Kaczmarek, J., Morys, J. NPY-, SOM- and VIP-containing interneurons in postnatal development of the rat claustrum. *Brain research bulletin*. 76 (2008) 565-571

Kowianski, P., Timmermans, J.P., Morys, J. Differentiation in the immunocytochemical features of intrinsic and cortically projecting neurons in the rat claustrum -- combined immunocytochemical and axonal transport study. *Brain research*. 905 (2001) 63-71

Kubota, Y., Shigematsu, N., Karube, F., Sekigawa, A., Kato, S., Yamaguchi, N., Hirai, Y., Morishima, M., Kawaguchi, Y. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cerebral Cortex*. 21 (2011) 1803-1817

Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E.J., Manning, R.W., Yu, S.H., Mulder, K.L., Westphal, H. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89 (1992) 6232-6236

LeVay, S., Sherk, H. The visual claustrum of the cat. I. Structure and connections. *The Journal of Neuroscience*. 1 (1981) 956-980

Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., McPherson, J.D., Waterston, R.H., Rodgers, J., Birney, E. Progress in sequencing the mouse genome. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. 31 (2001) 137-141

Lineberger, R.D. Cryoprotection by glucose, sucrose, and raffinose to chloroplast thylakoids. *Plant physiology*. 65 (1980) 298-304

- Lipowska, M., Kowianski, P., Majak, K., Jagalska-Majewska, H., Morys, J. The connections of the endopiriform nucleus with the insular claustrum in the rat and rabbit. *Folia morphologica*. 59 (2000) 77-83
- Luhmann, H.J. Review of imaging network activities in developing rodent cerebral cortex in vivo. *Neurophotonics*. 4 (2017) 031202
- Luskin, M.B., Price, J.L. The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. *The Journal of comparative neurology*. 216 (1983) 292-302
- Ma, Y., Hu, H., Berrebi, A.S., Mathers, P.H., Agmon, A. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 26 (2006) 5069-5082
- Macchi, G., Bentivoglio, M., Minciacchi, D., Molinari, M. Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing. *The Journal of comparative neurology*. 215 (1983) 121-134
- Majak, K., Pikkarainen, M., Kemppainen, S., Jolkkonen, E., Pitkanen, A. Projections from the amygdaloid complex to the claustrum and the endopiriform nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 451 (2002) 236-249
- Mamos, L., Narkiewicz, O., Morys, J. Neurons of the claustrum in the cat; a Golgi study. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 46 (1986) 171-178
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Review Neuroscience*. 5 (2004) 793-807
- Mathur, B.N. The claustrum in review. *Frontiers in System Neuroscience*. 8 (2014) 48
- Mathur, B.N., Caprioli, R.M., Deutch, A.Y. Proteomic analysis illuminates a novel structural definition of the claustrum and insula. *Cerebral Cortex*. 19 (2009) 2372-2379
- McBain, C.J., Fisahn, A. Interneurons unbound. *Nature Review Neuroscience*. 2 (2001) 11-23
- McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., Prince, D.A. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of neurophysiology*. 54 (1985) 782-806
- McDonald, A.J., Muller, J.F., Mascagni, F. GABAergic innervation of alpha type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase immunoreactive pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *The Journal of comparative neurology*. 446 (2002) 199-218
- Medina, L., Legaz, I., Gonzalez, G., De Castro, F., Rubenstein, J.L., Puelles, L. Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *The Journal of comparative neurology*. 474 (2004) 504-523

- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A.I., Hajos, N., Freund, T.F. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*. 16 (1996) 815-823
- Miyashita, T., Nishimura-Akiyoshi, S., Itohara, S., Rockland, K.S. Strong expression of NETRIN-G2 in the monkey claustrum. *Neuroscience*. 136 (2005) 487-496
- Morys, J., Berdel, B., Maciejewska, B., Sadowski, M., Sidorowicz, M., Kowianska, J., Narkiewicz, O. Division of the human claustrum according to its architectonics and morphometric parameters. *Folia morphologica*. 55 (1996) 69-82
- Nagy, A., Perrimon, N., Sandmeyer, S., Plasterk, R. Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nature genetics*. 33 Suppl (2003) 276-284
- Nassar, M., Simonnet, J., Lofredi, R., Cohen, I., Savary, E., Yanagawa, Y., Miles, R., Fricker, D. Diversity and overlap of parvalbumin and somatostatin expressing interneurons in mouse presubiculum. *Frontiers in neural circuits*. 9 (2015) 20
- Novick, A., Weiner, M. ENZYME INDUCTION AS AN ALL-OR-NONE PHENOMENON. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 43 (1957) 553-566
- Obst-Pernberg, K., Medina, L., Redies, C. Expression of R-cadherin and N-cadherin by cell groups and fiber tracts in the developing mouse forebrain: relation to the formation of functional circuits. *Neuroscience*. 106 (2001) 505-533
- Oliva, A.A., Jr., Jiang, M., Lam, T., Smith, K.L., Swann, J.W. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *The Journal of Neuroscience*. 20 (2000) 3354-3368
- Ouimet, C.C., McGuinness, T.L., Greengard, P. Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 81 (1984) 5604-5608
- Parra, P., Gulyas, A.I., Miles, R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron*. 20 (1998) 983-993
- Pearson, R.C., Brodal, P., Gatter, K.C., Powell, T.P. The organization of the connections between the cortex and the claustrum in the monkey. *Brain research*. 234 (1982) 435-441
- Pennacchio, L.A. Insights from human/mouse genome comparisons. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 14 (2003a) 429-436
- Pennacchio, L.A. Insights from human/mouse genome comparisons. *Mammalian Genome*. 14 (2003b) 429-436
- Pirone, A., Castagna, M., Granato, A., Peruffo, A., Quilici, F., Cavicchioli, L., Piano, I., Lenzi, C., Cozzi, B. Expression of calcium-binding proteins and selected neuropeptides in the human, chimpanzee, and crab-eating macaque claustrum. *Frontiers in System Neuroscience*. 8 (2014) 99



- Pirone, A., Cozzi, B., Edelstein, L., Peruffo, A., Lenzi, C., Quilici, F., Antonini, R., Castagna, M. Topography of Gng2- and NetrinG2-expression suggests an insular origin of the human claustrum. *PloS one*. 7 (2012) e44745
- Poldrack, R.A., Farah, M.J. Progress and challenges in probing the human brain. *Nature*. 526 (2015) 371-379
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., Rubenstein, J.L. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *The Journal of comparative neurology*. 424 (2000) 409-438
- Raj, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., Vargas, D.Y., Tyagi, S. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS biology*. 4 (2006) e309
- Ramon, Y.C.S. Structure and connections of neurons. *Bulletin of the Los Angeles Neurological Society*. 17 (1952) 5-46
- Riedemann, T., Schmitz, C., Sutor, B. Immunocytochemical heterogeneity of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in layers II and III of the mouse cingulate cortex: A combined immunofluorescence/design-based stereologic study. *The Journal of comparative neurology*. 524 (2016) 2281-2299
- Riedemann, T., Straub, T., Sutor, B. Two types of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the superficial layers of the mouse cingulate cortex. *PloS one*. 13 (2018) e0200567
- Rotheneichner, P., Belles, M., Benedetti, B., Konig, R., Dannehl, D., Kreutzer, C., Zaunmair, P., Engelhardt, M., Aigner, L., Nacher, J., Couillard-Despres, S. Cellular Plasticity in the Adult Murine Piriform Cortex: Continuous Maturation of Dormant Precursors Into Excitatory Neurons. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*. 28 (2018) 2610-2621
- Rubio, A., Belles, M., Belenguer, G., Vidueira, S., Farinas, I., Nacher, J. Characterization and isolation of immature neurons of the adult mouse piriform cortex. *Developmental neurobiology*. 76 (2016) 748-763
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., Hjerling-Leffler, J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental neurobiology*. 71 (2011) 45-61
- Ryding, A.D., Sharp, M.G., Mullins, J.J. Conditional transgenic technologies. *The Journal of endocrinology*. 171 (2001) 1-14
- Santana, R., McGarry, L.M., Bielza, C., Larranaga, P., Yuste, R. Classification of neocortical interneurons using affinity propagation. *Frontiers in neural circuits*. 7 (2013) 185
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*. 59 (1962) 223-239
- Sholl, D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy*. 87 (1953) 387-406

- Smith, J.B., Alloway, K.D., Hof, P.R., Orman, R., Reser, D.H., Watakabe, A., Watson, G.D.R. The relationship between the claustrum and endopiriform nucleus: a perspective towards consensus on cross-species homology. *The Journal of comparative neurology*. (2018)
- Smith, J.B., Radhakrishnan, H., Alloway, K.D. Rat claustrum coordinates but does not integrate somatosensory and motor cortical information. *The Journal of Neuroscience*. 32 (2012) 8583-8588
- Smythies, J., Edelstein, L., Ramachandran, V. Hypotheses relating to the function of the claustrum. *Frontiers in integrative neuroscience*. 6 (2012) 53
- Smythies, J., Edelstein, L., Ramachandran, V. Hypotheses relating to the function of the claustrum II: does the claustrum use frequency codes? *Frontiers in integrative neuroscience*. 8 (2014) 7
- Sternberg, N., Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology*. 150 (1981) 467-486
- Stewart, M., Wong, R.K. Intrinsic properties and evoked responses of guinea pig subicular neurons in vitro. *Journal of neurophysiology*. 70 (1993) 232-245
- Sugai, T., Yamamoto, R., Yoshimura, H., Kato, N. Multimodal cross-talk of olfactory and gustatory information in the endopiriform nucleus in rats. *Chemical senses*. 37 (2012) 681-688
- Sutor, B., Hagerty, T. Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochimica et biophysica acta*. 1719 (2005) 59-68
- Sutor, B., Zieglgansberger, W. A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons in vitro. *Pflügers Archiv*. 410 (1987) 102-111
- Suzuki, N., Bekkers, J.M. Inhibitory interneurons in the piriform cortex. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34 (2007) 1064-1069
- Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., Kaneko, T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *The Journal of comparative neurology*. 467 (2003) 60-79
- Tanaka, Y., Tanaka, Y., Furuta, T., Yanagawa, Y., Kaneko, T. The effects of cutting solutions on the viability of GABAergic interneurons in cerebral cortical slices of adult mice. *Journal of neuroscience methods*. 171 (2008) 118-125
- Tang, J.C., Rudolph, S., Dhande, O.S., Abaira, V.E., Choi, S., Lapan, S.W., Drew, I.R., Drokhlyansky, E., Huberman, A.D., Regehr, W.G., Cepko, C.L. Cell type-specific manipulation with GFP-dependent Cre recombinase. *Nature neuroscience*. 18 (2015) 1334-1341
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsiani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., Miyoshi, G., Shima, Y., Fishell, G., Nelson, S.B., Huang, Z.J. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*. 71 (2011) 995-1013

- Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N., Kim, T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., Bertagnolli, D., Goldy, J., Shapovalova, N., Parry, S., Lee, C., Smith, K., Bernard, A., Madisen, L., Sunkin, S.M., Hawrylycz, M., Koch, C., Zeng, H. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nature neuroscience*. 19 (2016) 335-346
- Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L., Melton, D.W. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*. 56 (1989) 313-321
- Tobimatsu, T., Fujisawa, H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. 264 (1989) 17907-17912
- Tremblay, R., Lee, S., Rudy, B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*. 91 (2016) 260-292
- Tseng, G.F., Haberly, L.B. Deep neurons in piriform cortex. I. Morphology and synaptically evoked responses including a unique high-amplitude paired shock facilitation. *Journal of neurophysiology*. 62 (1989) 369-385
- Urban-Ciecko, J., Barth, A.L. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nature Review Neuroscience*. 17 (2016) 401-409
- Vicente, M.I., Mainen, Z.F. Convergence in the piriform cortex. *Neuron*. 70 (2011) 1-2
- Wang, Q., Ng, L., Harris, J.A., Feng, D., Li, Y., Royall, J.J., Oh, S.W., Bernard, A., Sunkin, S.M., Koch, C., Zeng, H. Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. *The Journal of comparative neurology*. 525 (2017) 1317-1346
- Wang, X., Zhang, C., Szabo, G., Sun, Q.Q. Distribution of CaMKIIalpha expression in the brain in vivo, studied by CaMKIIalpha-GFP mice. *Brain research*. 1518 (2013) 9-25
- Watakabe, A., Ohsawa, S., Ichinohe, N., Rockland, K.S., Yamamori, T. Characterization of claustral neurons by comparative gene expression profiling and dye-injection analyses. *Frontiers in systems neuroscience*. 8 (2014) 98
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A.,

Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby, A., Kolbe, D.L., Korf, I., Kucherlapati, R.S., Kulbokas, E.J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J.P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J.P., Von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C., Lander, E.S. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420 (2002) 520-562

Watson, C., Puellas, L. Developmental gene expression in the mouse clarifies the organization of the claustrum and related endopiriform nuclei. *The Journal of comparative neurology*. (2016)

Watson, G.D.R., Smith, J.B., Alloway, K.D. Interhemispheric connections between the infralimbic and entorhinal cortices: The endopiriform nucleus has limbic connections that parallel the sensory and motor connections of the claustrum. *The Journal of comparative neurology*. 525 (2017) 1363-1380

Wojcik, S., Dziewiatkowski, J., Spodnik, E., Ludkiewicz, B., Domaradzka-Pytel, B., Kowianski, P., Morys, J. Analysis of calcium binding protein immunoreactivity in the claustrum and the endopiriform nucleus of the rabbit. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 64 (2004) 449-460

Wonders, C.P., Anderson, S.A. The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Review Neuroscience*. 7 (2006) 687-696

Woolgar, A., Jackson, J., Duncan, J. Coding of Visual, Auditory, Rule, and Response Information in the Brain: 10 Years of Multivoxel Pattern Analysis. *Journal of cognitive neuroscience*. 28 (2016) 1433-1454

Xu, X., Roby, K.D., Callaway, E.M. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *The Journal of comparative neurology*. 499 (2006) 144-160

Xu, X., Roby, K.D., Callaway, E.M. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *The Journal of comparative neurology*. 518 (2010) 389-404

Yin, Y., Miner, J.H., Sanes, J.R. Laminets: laminin- and netrin-related genes expressed in distinct neuronal subsets. *Molecular Cellular Neuroscience*. 19 (2002) 344-358

Young, P., Qiu, L., Wang, D., Zhao, S., Gross, J., Feng, G. Single-neuron labeling with inducible Cre-mediated knockout in transgenic mice. *Nature neuroscience*. 11 (2008) 721-728

Zhang, C., Szabo, G., Erdelyi, F., Rose, J.D., Sun, Q.Q. Novel interneuronal network in the mouse posterior piriform cortex. *The Journal of comparative neurology*. 499 (2006) 1000-1015

Zou, D.J., Greer, C.A., Firestein, S. Expression pattern of alpha CaMKII in the mouse main olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*. 443 (2002) 226-236